

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Šumanovac

Važnost proteinskih domena MATH i BTB u određivanju
polarnosti biljnih stanica

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i u „Biocenter Klein Flottbek, Developmental Biology and Biotechnology, University of Hamburg” pod vodstvom doc. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić.

Rad je predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. Dunji Lejak-Levanjić, koja je osmislila i vodila ovaj rad, na brojnim savjetima, razumjevanju i znanstvenoj izobrazbi.

Zahvaljujem dr. Nataši Bauer na brojnim praktičnim savjetima i pomoći tijekom eksperimentalnog rada u laboratoriju.

Zahvaljujem dr. Tomasu Dresselhausu što je omogućio da se dio eksperimenata izvede u Biocentru Klein Flottbek.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji na podršci tijekom studija i izrade ovog rada.

Zagreb, veljača 2009.

Ivana Šumanovac

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

VAŽNOST PROTEINSKIH DOMENA MATH I BTB U ODREĐIVANJU POLARNOSTI BILJNIH STANICA

Ivana Šumanovac

Prirodoslovno-matematički fakultet
Horvatovac 102
Zavod za molekularnu biologiju
HR-10000 Zagreb, Hrvatska

Nastanak različitih tipova stanica iz zigote višestaničnih organizama temelji se na postojanju unutarstanične polarnosti i asimetrične diobe. U zigotama i ranim stupnjevima razvoja embrija pšenice nađen je protein TaMAB2. U ovom radu je ispitan utjecaj dviju domena proteina TaMAB2, MATH i BTB, na uspostavljanje njegovog polarnog rasporeda i na asimetričnu diobu. Radi praćenja lokalizacije je korištena tehnika obilježavanja proteina GFP-om i postupak transformacije Biolistikom. Delecije su načinjene PCR-om. Delecija svake domene je utjecala na karakterističnu polarnu lokalizaciju proteina TaMAB2 mijenjajući njegov polaran raspored u stanici. Pri tome je delecija MATH domene u svim mikroskopiranim BMS stanicama uzrokovala promjenu afiniteta nakupljanja i polarne lokalizacije uz jezgrinu ovojnicu. Delecija BTB domene je uzrokovala promjenu polarne lokalizacije proteina TaMAB2 u 74% mikroskopiranih BMS stanica. Mikroskopiranje stanica epiderme luka je pokazalo slične rezultate. Ipak, još uvijek se ne zna točna uloga TaMAB2 u uspostavljanju stanične polarnosti i asimetrične diobe zigote.

56 stranica, 28 slika, 3 tablice, 34 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: (stanična polarnost, asimetrična dioba zigote, protein TaMAB2, proteinske domene MATH i BTB)

Voditelj: doc. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić
doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek
prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Rad prihvaćen: 11.2.2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

IMPORTANCE OF PROTEIN DOMAINS MATH AND BTB IN ESTABLISHMENT OF THE PLANT CELL POLARITY

Ivana Šumanovac

Faculty of Science.
Department of Molecular Biology
Horvatovac 102
HR-10000 Zagreb, Croatia

Development of different cell types from the zygote of multicellular organism is based on the establishment of the cell polarity and asymmetric cell division. Protein TaMAB2 was found in the zygote and early embryonic stages of wheat. In this thesis influence of the protein domains of TaMAB2, MATH and BTB, on its characteristic polar localisation on nuclear envelope was analysed. For this purpose GFP tagging of proteins was used for plant cell transformation. Deletions were made by using PCR. It was found that deletion of each domain influence the protein localisation by disturbing its polar distribution. While deletion of the MATH domain disturbed polar distribution in all BMS cells, deletion of the BTB domain changed polar localisation of TaMAB2 in 74% of BMS cells. Analysis of epidermal onion cells showed similar results. Precise role of TaMAB2 in establishment of the plant cell polarity and asymmetric cell division is still unknown.

56 pages, 28 figures, 3 tables, 34 references, original in: Croatian

Thesis deposited in: Central biological library

Key words: (plant cell polarity, asymmetric cell division, zygote, protein TaMAB2, protein domains MATH and BTB)

Supervisor: doc. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić

Reviewers: doc. dr. sc. Dunja Leljak-Levanić
doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek
prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Thesis accepted: 11.9.2009..

POPIS KRATICA

PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. Polimerase Chain Reaction)
MTOC	od engl. Microtubule Organizing Centre
MAP	od engl. Microtubule-Associated Proteins
WOX	<u>W</u> USHEL related home box
MAB	<u>M</u> ATH- <u>B</u> TB
MATH	od engl. mephrins and TRAF homology
TRAF	od engl. TNF receptor-associated factor
BTB	Bric-a-brac, Tramtrack and Broadkomplex
POZ	od engl. Pox virus and Zinc finger
GFP	zeleni fluorescencijski protein (od engl. Green Fluorescent Protein)
RFP	crveni fluorescencijski protein (od engl. Red Fluorescent Protein)
c-DNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
BMS	od engl. Black Mexican Sweetcorn
mRNA	glasnička (engl. messenger) ribonukleinska kiselina

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Unutarnji čimbenici polarnosti i asimetrične diobe	2
1.2	Mehanizmi uspostavljanja polarnosti i asimetrije u višestaničnim organizmima	3
1.3	Organizacija mikrotubula u regulaciji stanične diobe	4
1.4	Asimetrična dioba u životnom ciklusu biljaka	6
1.4.1	Asimetrične diobe tijekom razvoja ženskog gametofita	6
1.4.2	Asimetrična dioba prilikom razvoja peludi	7
1.4.3	Asimetrična dioba zigote	7
1.5	Nove metode u istraživanju ranog razvoja biljaka i stanične polarnosti	8
1.5.1	Uloga asimetričnog rasporeda mRNA u diobi zigote	8
1.5.2	Uloga proteina MAB u regulaciji asimetrične diobe zigote	9
1.6	Cilj rada	13
2	MATERIJAL I METODE	14
2.1	Materijal	15
2.1.1	Stanice	15
2.1.2	Hranjive podloge	15
2.1.3	Plazmidni vektori	17
2.1.4	Kemikalije	18
2.2	Metode	20
2.2.1	Kultura stanica i tkiva	20
2.2.2	Stvaranje plazmida za prolaznu transformaciju biljnih stanica	20
2.2.3	Transformacija biljnih stanica	25
2.2.4	Mikroskopiranje	26
3	REZULTATI	27
3.1	Rezultati reakcije PCR	28
3.2	Rezultati određivanja primarnog slijeda nukleotida	29
3.3	Rezultati izolacije plazmida za postupak transformacije biljnih stanica	29
3.4	Stanična lokalizacija proteina TaMAB2	32
3.4.1	Stanična lokalizacija proteina TaMAB2 Δ MATH	33
3.4.1	Stanična lokalizacija proteina TaMAB2 Δ BTB	36
3.5	Rezultati bioinformatičke analize	38
3.5.1	Rezultati predviđanja sekundarne strukture	38
3.5.2	Rezultati ClustalW analize	41
4	RASPRAVA	43
4.1	Važnost domene MATH za lokalizaciju proteina TaMAB2	44
4.2	Važnost domene BTB za lokalizaciju proteina TaMAB2	46
4.3	Promjena lokalizacije TaMAB2 u mitozu	47
5	ZAKLJUČAK	50
6	LITERATURA	52

1 UVOD

Nastanak različitih tipova stanica iz zigote višestaničnih organizama, kao što su biljke i životinje, temelji se na postojanju unutarstanične polarnosti i asimetrične diobe. Asimetrična dioba se može u nekim slučajevima očitovati u različitoj veličini stanica kćeri, no nužno se novonastale stanice razlikuju na molekularnoj razini to jest po sadržaju specifičnih regulatornih molekula.

Kako bi različita sudbina stanica kćeri nakon diobe bila uvjetovana nejednakim sadržajem unutarnjih čimbenika asimetrije naslijeđenih od stanice majke, oni moraju biti nejednako raspoređeni prije uspostavljanja diobene ravnine, ili će do uspostave polarnosti doći nakon diobe zbog asimetrične razgradnje mRNA regulatornih molekula ili regulatornih proteina u samo jednoj od dvije novonastale stanice (Heidstra 2007). Za oba procesa je neophodna precizna usklađenost između polarnog smještanja čimbenika asimetrije i postavljanja osi diobenog vretena, pri čemu nije isključen utjecaj okolnih stanica i vanjskih čimbenika na postavljanje same osi diobenog vretena (Scheres i sur. 1999).

1.1 Unutarnji čimbenici polarnosti i asimetrične diobe

Prilikom asimetrične diobe i nastanka dviju stanica različitih sudbina, unutarnji čimbenici se nakon diobe nasljeđuju u jednu stanicu kćer, a njihova prisutnost ili odsutnost određuje njenu sudbinu. Unutar stanice koja ulazi u diobu se prije uspostavljanja asimetrične diobe narušava simetrija pa ona postaje polarna. Nakon uspostavljanja početne polarnosti, čimbenici asimetrije se raspoređuju prema određenom dijelu asimetrične stanice majke, a potom se diobeno vreteno usmjerava tako da čimbenici asimetrije dospiju u samo jednu stanicu kćer (Gonczy 2008). U biljnom carstvu do sada nije poznata niti jedna molekula za koju se sa sigurnošću može reći da ima ulogu unutarnjeg čimbenika uspostavljanja asimetrične diobe biljnih stanica.

Ovakav model uspostavljanja asimetrije je opisan tijekom asimetrične diobe kvasca, u kojoj se bjelančevina Ash1 nasljeđuje samo u manju nastalu stanicu. Ash1 (engl. asymmetric synthesis of HO). je negativni regulator transkripcije gena *HO* (od engl. homothallism). On se prepisuje u stanici majci samo kratko između G1 i S faze stanišnog ciklusa, a njegov produkt je endonukleaza koja omogućuje stanici promjenu tipa sparivanja. Samo manja stanica nasljeđuje protein Ash1 pa zato ne

može mijenjati tip sparivanja (Bobola i sur. 1996). Asimetrična lokalizacija bjelančevine Ash1 se postiže polarnim raspoređivanjem mRNA uz pomoć aktinskog mehanizma koji uključuje miozinski motor. Možda je izravno uzrokovana polarizacijom aktinskog citoskeleta zbog aktivnosti malih GTP-aza, koje su također asimetrično aktivirane u korteksu stanice (Long i sur. 1997).

Aktivacija GTP-aza posredovana je proteinom Bud3 (od engl. bud) koji je također uključen u regulaciju lokalizacije jednog od dva tjelešca diobenog vretena i utemeljenje orijentacije diobenog vretena (Chant i sur. 1995). Upravo sudjelovanje istog Bud3 proteina u uspostavljanju polarnosti i u orijentiranju diobenog vretena osigurava smještanje Ash1 samo u jednu stanicu kćer (Chant 1996).

1.2 Mehanizmi uspostavljanja polarnosti i asimetrije u višestaničnim organizmima

U stanicama kukaca i nematoda utvrđeno je postojanje tri različita mehanizma asimetričnog raspoređivanja unutarnjih čimbenika asimetrije: asimetričnim rasporedom mRNA, različitom lokalizacijom proteina te različitom stabilnošću i razgradnjom proteina u stanicama kćerima.

Asimetrija uzrokovana različitim rasporedom mRNA je prisutna tijekom diobe oocite vrste *Drosophila melanogaster*, u kojoj se na posteriornom kraju usidri mRNA *oskar*, čiji je proteinski produkt uključen u organizaciju citoplazme posteriornog pola, i bez njega se embrio ne može normalno razvijati.

Mehanizam uspostavljanja asimetrije, temeljen na različitoj lokalizaciji proteina, je dobro istražen na primjeru asimetrične diobe u neuroblastima embrija vrste *Drosophila melanogaster*. Unutarnji čimbenici Numb i Prospero se prije diobe raspoređuju na bazalnu stranu, u odnosu na apikalno-bazalnu os, uz pomoć aktinskog mehanizma. Transmembranski receptori Frizzled utječu na smještanje proteina Numb i na smjer dioba stanica SOP u odnosu na apikalno-bazalnu os tijela, što pokazuje da su izvanstanični signali važni za postavljanje osi diobenog vretena u odnosu na apikalno-bazalnu os tijela (Gho 1997).

Prekursori stanica središnjeg živčanog sustava vrste *Drosophila melanogaster* također se dijele asimetrično. Za vrijeme diobe neuroblasta samo stanica iz koje nastaju glija stanice naslijeđuje protein Prospero. Numb i Prospero kolokaliziraju u

stanicama i na bazalnoj strani stvaraju polumjesec. Za njihovu je lokalizaciju neophodan aktinski citoskelet, a za ispravno smještanje proteina Numb i Prospero, u odnosu na os diobenog vretena i u odnosu na apikalno-bazalnu os, su važni mikrotubuli (Knoblich 1997).

Treći mehanizam utemeljenja polarnosti tijekom diobe i različitosti među novonastalim stanicama je različita stabilnost proteina. Različita stabilnost proteina je odgovorna za asimetričnu diobu u somatskim stanicama embrija vrste *C.elegans*. U njima E3 ubikvitinske ligaze ovisne o kulinu razgrađuju specifične proteine u samo jednoj od stanica kćeri (slika 1).



Slika 1. Asimetrična lokalizacija transkripcijskog faktora PIE1 (zeleno) prilikom diobe zigote vrste *C. elegans*. Do potpune eliminacije PIE1 iz donje stanice dolazi nakon diobe, razgradnjom na proteosomima (Preuzeto iz Gönczy 2008).

1.3 Organizacija mikrotubula u regulaciji stanične diobe

Kod životinja položaj centrosoma određuje smjer odvajanja kromosoma i položaj diobene ravnine. Centrosomi organiziraju mikrotubule, te služe kao središta njihove organizacije - MTOC (od engl. Microtubule Organizing Centre) (Andersen 2003). Položaj diobenog vretena je važan za asimetričnu diobu općenito, a određen je hvatanjem mikrotubula iz centrosoma kao središta organizacije za staničnu periferiju koja se nalazi s unutrašnje strane plazmaleme (White i sur. 1996, Chant 1996). U stanicama nematode *C.elegans* bi ulogu hvatanja mikrotubula za staničnu periferiju mogle imati aktinske nakupine, koje obilježavaju mjesto prijašnje diobe, dok bi kod kvasca tu ulogu mogao obavljati protein Bud3.

Biljke za razliku od životinja i kvasca nemaju centrosome niti polarna tjelešca, ali mogu stvarati funkcionalno i organizirano diobeno vreteno jer posjeduju strukture koje mogu organizirati mikrotubule i obavljati ulogu organizacijskih centara mikrotubula. Glavna zajednička osobina organizacijskih centara mikrotubula je specifičan molekularni sastav, čija je glavna komponenta gama tubulin. U biljnoj stanici jezgrina ovojnica nakuplja gama tubulin pa se pretpostavlja da ona djeluje kao organizacijski centar mikrotubula, a prisutnost MAP proteina (od engl. Microtubule-Associated Proteins) dodatno potvrđuje sposobnost nukleacije mikrotubula na vanjskoj jezgrinoj membrani (Stoppin i sur. 1996).

Neki od proteina za koje se pouzdano zna da reguliraju dinamiku mikrotubula u biljnim stanicama su: AtMAP65-1, AtMAP65-4 i AtMAP65-5. AtMAP65-1 i AtMAP65-5 reguliraju skupljanje mikrotubula stanične periferije i prisutni su tijekom cijelog života stanice. Za razliku od njih, AtMAP65-4 se nalazi isključivo na jezgrinoj ovojnici i u mikrotubulima diobenog vretena, a prisutan je u najvećoj količini tijekom stvaranja diobenog vretena mitotskih stanica. Njegova prisutnost potvrđuje važnost biljne jezgrine ovojnice za organiziranje mikrotubula i diobu.

Biljna jezgrina ovojnica je kao glavno središte organizacije mikrotubula, za razliku od životinjskog centrosoma i kvašćevog diobenog tjelešca, prilično neistražena. Za vrijeme staničnog ciklusa jezgrina ovojnica prolazi kroz dinamične promjene, ima sposobnost razgradnje u određenim dijelovima ciklusa, a zatim ponovnog stvaranja oko kromatina (Brandizzi 2004). Tijekom staničnog ciklusa biljne stanice sadrže još dvije karakteristične strukture koje se sastoje od mikrotubula. To su prijeprofazna vrpca i fragmoplast. Prijeprofazna vrpca nastaje u kasnoj G2 fazi u području ekvatora uz staničnu membranu oko jezgre. Sastavljena je od gustog snopa perifernih mikrotubula u obliku prstena, vezanih uz unutrašnjost stanične membrane, a nestaje kad stanica uđe u mitozu.

Fragmoplast stvara staničnu ploču, također je prstenastog oblika u ekvatorijalnom dijelu stanične periferije s unutrašnje strane uz plazmalemu, ali se na prijelazu iz anafaze u telofazu povećava, a kad stanica uđe u G1 fazu nestaje. (Lambert i Lloyd 1994). Stanična ploča raste od središta diobene ravnine prema periferiji, dok se ne spoji s ranije obilježenim mjestom uz pomoć prijeprofazne vrpce. Ona raste spajanjem Golgijevog aparata s materijalom za novu staničnu stijenku (Verma 2001).

Mikrotubuli s jezgrine membrane mogli bi sudjelovati u stvaranju prijemprofazne vrpce, koja privremeno obilježava mjesto buduće diobe, a prethodi joj stvaranje jednako usmjerene, samo manje guste mreže perifernih mikrotubula na istom mjestu u interfazi, što jasno pokazuje da se polarnost citoskeleta poklapa s ravninom diobe prije nego se izabere točno mjesto diobe (Lloyd 1991). Mikrotubuli s jezgrine membrane su također važni za smještanje jezgre, čimbenika diferencijacije i ostalih staničnih komponenti te za ispravno usmjeravanje diobenog vretena

Pokusi su pokazali da se promjenom mjesta jezgre centrifugiranjem može stvoriti nova prijemprofazna vrpca (Murata i Wada 1991). Ovime se dodatno potvrđuje uloga jezgrine ovojnice u organizaciji mikrotubula tijekom staničnog ciklusa.

Na jezgrinoj ovojnici, u preprofaznim vrpcama, fragmoplastima i u diobenom vretenu stanica duhana BY-2, uočeno je nakupljanje proteasoma 26S (Yanagawa i sur. 2002). On u stanicama kvasca i sisavaca, uz korištenje ATP-a, razgrađuje proteine obilježene ubikvitinom. U kulturi sinkroniziranih stanica duhana BY-2, raspored proteasoma 26S se mijenja dinamično u skladu sa staničnim ciklusom, a inhibicija proteasoma 26S uzrokuje zastoj u prolasku kroz stanični ciklus. Inhibicija uzrokuje zastoj u ranim stupnjevima stvaranja prijemprofazne trake, u G2 fazi, prilikom raspadanja fragmoplasta i u metafazi. Prisutnost proteasoma 26S u prijemprofaznim trakama i fragmoplastima ukazuje na njegovu važnost za prijelaz iz mitoze u fazu G1 te za određivanje ravnine diobe (Yanagawa i sur. 2002).

1.4 Asimetrična dioba u životnom ciklusu biljaka

Postoji više primjera asimetrične diobe tijekom razvoja viših biljaka: prva dioba zigote uročnjaka, dioba hipofize, dioba muške mikrospore i dioba koja stvara stomatalni kompleks (Scheres i Benfey 1999), kao i diobe tijekom razvitka ženskog gametofita.

1.4.1 Asimetrične diobe tijekom razvoja ženskog gametofita

Razvoj ženskog gametofita u biljaka sastoji se od dva procesa; megasporogeneze i megagametogeneze. Iz specijaliziranih stanica unutar sjemenog zametka razvija se polarizirana megasporocita. Polarizacija se može vidjeti asimetričnim rasporedom organela duž osi između mikropilarnog i halazarnog kraja,

odlaganjem kaloze i stvaranjem plazmodezmija samo na halazarnom kraju. Nakon mejotske diobe nastaju četiri megaspore, ali samo megaspora najbliža halazarnom kraju preživljava. Ona se tri puta mitotski dijeli i prolazi kroz proces citokineze kako bi stvorila zreli ženski gametofit ili embrionsku vreću sa sedam stanica. Prije stvaranja sedmostanične embrionske vreće na mikropilarnom kraju se nalaze dvije jezgre sinergide, jajna jezgra i jedna polarna jezgra, a na halazarnom kraju se nalaze tri antipode i druga polarna jezgra. Nakon što se dvije polarne jezgre pomaknu prema središtu i spoje, nastaje diploidna središnja jezgra, događa se citokineza i nastaje stanična stijenka između jezgara (Huang i Sheridan 1994). Zreli ženski gametofit ili embrionska vreća se sastoji od četiri različita tipa stanica koje prolaze kroz različite razvojne putove: jajne stanice, dvije sinergide, velike središnje stanice i antipoda.

1.4.2 Asimetrična dioba prilikom razvoja peludi

Prilikom razvoja peludi u anterama se događa mejoza kako bi nastale haploidne mikropore u tetradama. Nakon prve mejotske diobe i otpuštanja haploidnih mikrospora iz tetrada, one se dijele asimetrično na veću vegetativnu stanicu i manju generativnu stanicu (Twell i sur. 1998). Prije same diobe mikrospora se polarizira, raspored organela i citoplazme je takav da većina nakon diobe dospije u vegetativnu stanicu, a polarizirano je i diobeno vreteno tako da je tupo na polu buduće germinativne stanice, a trokutastog oblika na polu vegetativne stanice (Heslop-Harrison 1971). Vegetativna stanica se više ne dijeli, dok se germinativna stanica simetrično podijeli da bi stvorila dvije spermatocite. Tako nastaje zreli muški gametofit koji se sastoji od jedne veće vegetativne stanice i dvije manje spermalne stanice koje sudjeluju u oplodnji.

Ako se mikropore kultiviraju u uvjetima in vitro, one se normalno polariziraju, dijele asimetrično i stvaraju funkcionalan polen, što ukazuje da je ova asimetrija uzrokovana isključivo unutarnjim čimbenicima (Eady i sur. 1995).

1.4.3 Asimetrična dioba zigote

Da bi se dogodila oplodnja i nastala zigota, cvjetovi se moraju oprašiti sa peludi, muškim gametofitima. Vegetativna stanica peludnog zrna nakon oprašivanja raste i stvara peludnu mješinicu. Ona donosi spermalne stanice do ženskog gametofita (McCormick 1993). Nakon oslobađanja spermalnih stanica u ženski

gamtofit događa se dvostruka oplodnja. Jajna stanica se spaja s jednom spermalnom stanicom i nastaje zigota. Druga spermalna stanica se stapa sa središnjom stanicom da bi mogao nastati endosperm, koji hrani embrio (Yadegari i Drews 2004).

Prva dioba biljne zigote je morfološki dobro opisana kao asimetrična, pri čemu nastaje mala apikalna i veća bazalna stanica, uvijek u istoj orijentaciji u odnosu na halazalno-mikropilarnu os. Međutim, zbog činjenice da su embriji viših biljaka okruženi majčinskim tkivom i do nedavno ih je, zbog njihove nedostupnosti, bilo teško istraživati, nepoznati su molekularni mehanizmi kontrole i regulacije asimetrične diobe zigote, koja se mora uspostaviti ubrzo nakon oplodnje.

1.5 Nove metode u istraživanju ranog razvoja biljaka i stanične polarnosti

Metode izolacije pojedinačnih stanica iz embrionske vreće pšenice omogućila su istraživanja razlike u genskoj ekspresiji jajne stanice, zigote, dvostaničnog embrija i ostalih stupnjeva u razvoju duhana, kukuruza i pšenice (Kumlehn i sur. 1999). To je omogućilo otkriće novih gena koji bi mogli imati ulogu u asimetričnoj diobi zigote (Okamoto i sur. 2005, Sprunck i sur. 2005, Ning i sur. 2006). Kod mnogih vrsta je mRNA iz jajne stanice uključena u uspostavljanje apikalno-bazalne osi embrija, diferencijaciju različitih tipova stanica i stvaranje oblika tijela u ranim stupnjevima razvoja embrija (Mohr i sur. 2001).

1.5.1 Uloga asimetričnog rasporeda mRNA u diobi zigote

Analizom genoma uročnjaka utvrđeno je postojanje transkripcijskih aktivatora sličnih transkripcijskim aktivatorima HOX kod vrste *Drosophila melanogaster*. Već nakon prve diobe zigote zamijećena je razlika u sadržaju i vrsti mRNA između apikalne i bazalne stanice uročnjaka te karakteristični raspored transkripata gena iz obitelji *WOX* (*WUSHEL related homebox*). Geni *WOX* su biljni homolozi gena *Homebox*. Kao što transkripcijski faktori homebox svojom različitom ekspresijom u pojedinim dijelovima embrija vrste *Drosophila melanogaster* određuju smjer postavljanja anteriorno-posteriorne osi, diferencijaciju stanica te postanak određenog dijela tijela na specifičnom položaju, u odnosu na os, tako i biljni homolozi

transkripcijskih aktivatora WOX imaju karakterističnu ekspresiju u pojedinim dijelovima biljnog embrija.

Svaku od četiri domene ranog embrija uročnjaka obilježava karakteristična ekspresija WOX gena. Oni bi mogli pokretati početni program transkripcije, koji bi potom postao specifičan za pojedine dijelove embrija. Tako bi se osnovni plan građe mogao razviti iz stanica prekursora, čiji je razvoj određen već u najranijim stupnjevima embriogeneze.

Iako jajna stanica i zigota sadrže molekule mRNA obaju gena WOX2 i WOX8, bazalna stanica odmah nakon diobe sadrži isključivo mRNA WOX8, a vršna WOX2. Takav raspored ukazuje na sposobnosti razdvajanja unutarnjih komponenti stanice prilikom diobe i postojanje unutarnjih čimbenika koji utječu na asimetričnu diobu zigote. Tijekom razvoja embrija asimetričnost je održana tako da je za apikalni dio osmostaničnog embrija uročnjaka karakteristična ekspresija mRNA WOX2, za središnji WOX 2 i WOX9. Hipofiza sadrži mRNA WOX8 i WOX9, a suspensor WOX8. U osmostaničnom embriju uročnjaka transkripcija WOX9 mRNA prestaje u hipofizi, a počinje u doljnje četiri stanice embrija, dok je u šesnaeststaničnom embriju ograničena samo na stanice protoderma. U kasnijim stadijima razvoja embrija WOX9 mRNA nalazi se u stanicama na granici između hipokotila i korijena (Haecker i sur. 2003).

Zbog ranog uspostavljanja asimetrije jajne stanice postoji mogućnost da majčinsko tkivo stvara vanjske signale i tako utječe na uspostavljanje osi asimetrije i smjer prve diobe. Suprotno tome zigote kukuruza i duhana stvorene in vitro oplodnjom također se dijele asimetrično i stvaraju embrio s manjom apikalnom stanicom bogatom citoplazmom i većom vakuoliziranom bazalnom stanicom te se razvijaju u normalne i fertilne biljke, što pokazuje da utjecaj majčinskog tkiva nije neophodan za asimetričnu diobu zigote te da je ona vjerovatno uvjetovana unutarnjim faktorima (Heidstra 2007).

1.5.2 Uloga proteina MAB u regulaciji asimetrične diobe zigote

Geni za MAB (MATH-BTB) proteine se prepisuju u jajnim stanicama i ranim stupnjevima razvoja embrija mnogih vrsta. Geni za MAB proteine su nađeni u genomima čovjeka, štakora, oblića, vinske mušice, uročnjaka, pšenice, riže i drugih biljaka i životinja. Osobito su zastupljeni u genomu vrste *C.elegans*, koji sadrži oko

50 MAB gena (Thomas 2006) i u genomu riže gdje ih ima najmanje 69 (Viestra 2007). Nadalje ekspresija MAB gena miša je najveća u dvostaničnom stupnju razvoja embrija (Huang 2004) što ukazuje na važnu ulogu MAB proteina tijekom diobe zigote općenito.

1.5.2.1 Struktura MAB proteina

Obitelj MAB proteina karakterizira sličan sadržaj i raspored proteinskih domena. Sastoje se od MATH domene na N-kraju te BTB domenom na C-kraju (Huang 2004). Spajanje MATH i BTB domene je evolucijski gledano vrlo povoljan proces jer je kombinacija tih dviju domena jedna od najčešćih kombinacija različitih domena među svim proteinima (Vogel i sur. 2004). Zbog očuvanosti tih domena u mnogim MAB proteinima, pretpostavlja se da one imaju važnu ulogu u pojedinim staničnim procesima.

MATH domena (od mephrins and TRAF homology) može se zvati i TRAF domena (od TNF receptor-associated factor) jer spada u skupinu domena sličnih TRAF-u. Nalazi se u izvanstaničnim metaloproteinazama - meprinima, a česta je u proteina uključenih u citoplazmatski put prijenos signala (Bradley i Roberts 2001). Filogenetske analize pokazuju njezinu dugu evolucijsku povijest i prisutnost u različitim proteinima (Uren i Vaux 1996).

BTB domena je važna za prijenos signala i razgradnju proteina, kako kod jednostavnih organizama kao što su pivski kvasac, tako i kod višestaničnih organizama kao što su kukci i sisavci, a u višestaničnim organizmima je prisutna i u transkripcijskim faktorima (Perez-Torrado i sur. 2006). Pronađena je kao motiv u primarnom slijedu nukleotida gena DNA virusa (Koonin i sur. 1992). Kada je opaženo je da se u transkripcijskim faktorima Bric-a-brac, Tramtrack i Broadkompleks nalazi na N kraju sekvenca slična virusnoj, domena je dobila ime BTB (Bric-a-brac, Tramtrack and Broadkomplex) (Godt i sur. 1993). Također je istovremeno uočeno da neki proteini poksvirusa sliče na proteine s cinkovim prstom ZID, GAGA i ZF5 pa je ta domena nazvana i POZ (od engl. Pox virus and Zinc finger) (Zollman i sur. 1994). Najvjerojatnije je nastala nakon odvajanja eukariota jer još nije pronađena u arheobakterijama ni bakterijama, osim u vrste *Candidatus Protochlamidya amoebophila*, endosimbiontu amebe, koji je najvjerojatnije ishodište ove domene (Horn i sur. 2004).

BTB domene različitih proteina odlikuju se velikom varijabilnošću u primarnom slijedu aminokiselina, no unatoč tome njihova sekundarna struktura i ukupni trodimenzionalni raspored ostaju relativno slični. Jezgra se sastoji od 5 α zavojnica iza kojih slijedi kratki trolančani β nabrani list. Od oko 95 aminokiselina samo je deset hidrofobnih aminokiselina iz unutrašnjosti konzervirano, a ostale vanjske aminokiseline su varijabilne i o njima ovise vezne sposobnosti domena (Stogios i sur. 2005). Vezne sposobnosti BTB domena utječu na proteine koji ju sadrže i na njihove sposobnosti razgradnje drugih proteina te na sposobnosti regulacije transkripcije (Perez-Torrado i sur. 2006).

U Skp1 proteinu, koji je uključen u razgradnju proteina, i Elonginu C, koji kontrolira elongaciju transkripcije, BTB domena se nalazi sama, no najčešće je u kombinaciji s drugim domenama. Nađena je u kombinaciji s više od dvadeset različitih domena, no u najvećem broju proteina je spojena s MATH domenom. Također ju se može naći s Kelch domenom, NPH3 domenom, prijenosnicima iona i cinkovim prstom. BTB-NPH3 proteini su prisutni samo u uročnjaku, dok kod njega nema BTB-Kelch ni BTB-ZF proteina. *C. elegans* također nema BTB-Kelch ni BTB-ZF proteine, ali ima iznimno mnogo različitih MAB proteina zbog mogućeg pozitivnog selekcijskog pritiska (Perez-Torrado i sur. 2006).

1.5.2.2 Uloga MAB proteina

Ne zna se točna uloga MAB proteina u biljnim stanicama, kao ni uloga proteina TaMAB2 u uspostavljanju stanične polarnosti i asimetrične diobe, no u stanicama vrste *C. elegans* je dobro istražena uloga MAB proteina Mel 26.

Mel 26 je važan za razvoj ranih stupnjeva embrija vrste *C. elegans*, gdje služi kao podjedinica ubikvitinske ligaze E3 (Bowerman i Kurz, 2006). Ubikvitinska ligaza E3 i Mel 26 su važni za ubikvitinaciju i odgovorni su za brzu razgradnju proteina katanina (CeMEI1) i proteina CeFIGL1 za vrijeme mejoze ili nakon oplodnje, na prijelazu iz mejoze u mitozu.

Katanin je neophodan za stvaranje kratkog, acentrosomalnog, mejotskog diobenog vretena tako što potiče stvaranje kratkih mikrotubula. Iako je važan u mejozi, za ispravan razvoj embrija vrste *C. elegans*, on se mora nakon mejoze brzo razgraditi, kako bi moglo nastati dugo diobeno vreteno neophodno za iduću mitotsku diobu. Za razliku od katanina, FIGL1 se razgrađuje za vrijeme mejoze, kako ne bi ometao stvaranje kratkih mikrotubula, ali je zaštićen od razgradnje za vrijeme mitoze,

jer tada sudjeluje u stvaranju dugog mitotskog diobenog vretena. Tako razgradnja proteina ubikvitinacijom uz pomoć MAB proteina Mel 26 sudjeluje u regulaciji citoskeleta, stvaranju diobenog vretena i regulaciji dužine diobenog vretena, na prijelazu iz mejoze u mitozu prilikom razvoja embrija vrste *C. elegans* (Luke-Glaser i sur. 2007).

1.5.2.3 MAB proteini u biljkama

Uročnjak u svojem genomu ima šest *MAB* gena koji su vrlo konzervirani i imaju konstitutivnu ekspresiju, no samo četiri puta veći genom riže ih sadrži najmanje 69. Unatoč velikom broju *MAB* gena u genomu riže, njihovi su transkripti slabo prisutni u ekspresijskim bazama podataka. Pretpostavlja se da je tomu uzrok vremenski ili prostorno ograničena ekspresija.

MAB geni pšenice i kukuruza se prepisuju samo za vrijeme ranih stupnjeva oogeneze i embriogeneze u određenim stanicama embrionske vreće, što ukazuje na njihovu važnost za razvoj gametofita, oplodnju i početak embriogeneze (Leljak-Levanić i sur. neobjavljeni rad). Nadalje isti su autori pokazali da se protein TaMAB2 u stanicama raspoređuje polarno pa je moguće da je uključen u uspostavljanje asimetrije prilikom premještanja mikrotubula, koje prethodi prvoj diobi zigote.

MAB proteini uročnjaka i riže stupaju u reakcije s proteinima iz obitelji kulina 3 i neophodni su za ispravan razvoj embrija (Dieterle i sur. 2005), gdje vjerovatno, slično kao i u nematode *C. elegans*, služe kao adaptori za selektivno vezanje supstrata na ubikvitinske ligaze E3 (Derek i sur. 2007). Razgradnja proteina na proteasomima ovisi o ubikvitinu i važna je za preciznu regulaciju prolaska kroz stanični ciklus i za ostale stanične procese.

1.6 Cilj rada

Analizom primarnog slijeda nukleotida c-DNA, dobivene iz dvostaničnih embrija pšenice, utvrđeno je da TaMAB2 sadrži 381 aminokiselinu i dvije odvojene domene: MATH na N kraju i BTB na C kraju. Gen *TaMAB2* se prepisuje isključivo nakon oplodnje u zigoti i dvostaničnom embriju. Uz pomoć tehnike lokalizacije zelenim fluorescencijskim proteinom GFP-om (od engl. Green Fluorescent Protein) otkriveno je da se protein TaMAB2 polarno nakuplja s jedne strane jezgrine ovojnice u obliku kape ili polumjeseca (Leljak-Levanić i sur., neobjavljeni rad).

Cilj ovog rada je bio ispitati važnost domena MATH i BTB za lokalizaciju proteina TaMAB2 u stanici uz pomoć tehnike obilježavanja proteina GFP-om, te tako ispitati njihov utjecaj na uspostavljanje polarnosti u biljnim stanicama.

2 MATERIALIJAL I METODE

2.1 Materijal

2.1.1 Stanice

2.1.1.1 Biljne stanice

Lokalizaciju proteina TaMAB2 sam pratila u BMS (od engl. Black Mexican Sweetcorn) stanicama uzgajanim u suspenziji i stanicama epiderme luka (*Allium cepa*).

2.1.1.2 Bakterije

Za umnažanje ligiranih plazmida sam koristila kompetentne stanice *E. coli* soj JM109 (Promega) za kemijsku transformaciju

2.1.2 Hranjive podloge

2.1.2.1 Hranjiva podloga za biljne stanice

Za uzgoj BMS stanica sam upotrijebila tekuću osnovnu hranjivu podlogu MS (Murashige i Skoog, 1962) uz dodatak saharoze (30 g/l) i 2,4-D (2 mg/l). Za transformaciju sam koristila krutu osmotsku podlogu MS (0,8% gel-rite), u kojoj je saharoza bila zamijenjena dodatkom maltoze (239,61 g/l). Za mikroskopiranje sam stanice premjestila u standardni MS medij. Sastav hranjivih podloga uz korištene promjene opisan je u tablici 1.

Vrijednost pH hranjivih podloga sam podesila prije autoklaviranja na 5,6. Hranjive podloge sam sterilizirala autoklaviranjem, 15 min, 121° C, 150 kPa. Stakleno i plastično posuđe sterilizirala sam također autoklaviranjem, 24 min, 121° C, 150 kPa. Metalni pribor sam sterilizirala tijekom rada uranjanjem u 96%-tni etanol i spaljivanjem na plameniku. Sve eksperimentalne postupke obavljala sam u aseptičkim uvjetima u komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka ("laminaru").

2.1.2.2 Hranjive podloge za bakterije

Za umnažanje transformiranih bakterija *E. coli* sam upotrijebila

- LB hranjivu podlogu (Lurija-Bertani): 10 g/l NaCl, 5 g/l suhi ekstrakt kvasca, 10 g/l baktotripton

Za selekciju transformiranih bakterija sam upotrijebila:

- LB hranjivu podlogu s dodatkom karbenicilina (50 mg/l)
- krutu LB podlogu s dodatkom karbenicilina (20 g/l agar; 50 mg/l karbenicilin).

Tablica 1. Sastav hranjivih podloga MS korištenih za biljne stanice.

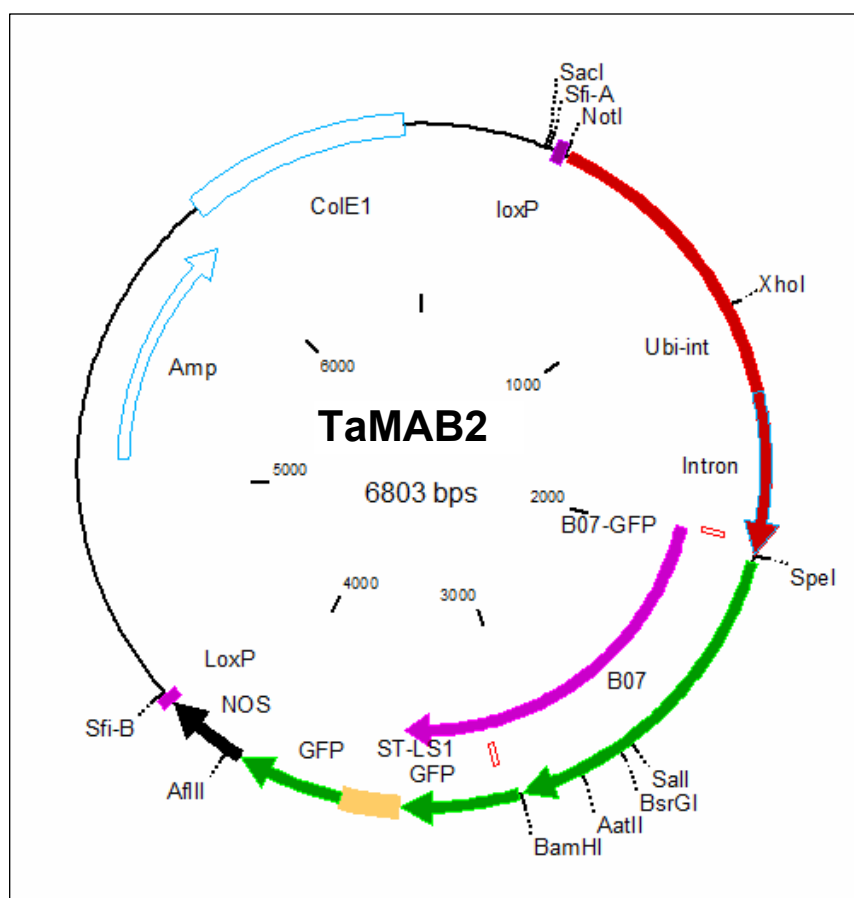
Sastojci	Koncentracija mg/ml	Standardna MS podloga	MS podloga Za uzgoj suspenzije	Kruta osmotska MS podloga
Makroelementi				
NH ₄ NO ₃	1650,00	+	+	+
KNO ₃	1900,00	+	+	+
CaCl ₂ × 2H ₂ O	440,00	+	+	+
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370,00	+	+	+
KH ₂ PO ₄	170,00	+	+	+
Mikroelementi				
H ₃ BO ₄	6,20	+	+	+
MnSO ₄ × H ₂ O	11,20	+	+	+
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	5,80	+	+	+
KI	0,80	+	+	+
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	+	+	+
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025	+	+	+
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025	+	+	+
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,80	+	+	+
Na ₂ EDTA×2H ₂ O	37,30	+	+	+
Organski dodaci				
Saharoza	30 g/l		+	
Maltoza	239,61 mg/l			+
Čimbenici rasta				
2,4 D	2 mg/l		+	
Tvari za skrutnjivanje				
Gel-rite	80 g/l			+

2.1.3 Plazmidni vektori

Pri izradi ovog rada upotrijebila sam plazmidne vektore pLNUG i pH7WGR2-TUA6-RFP.

Plazmidni vektor pLNU-GFP (UBIp:GFP:NOS) ima mjesto za kloniranje između promotora kukuruza *Ubi* i gena za GFP biljeg. Gen za GFP ima intron ST – LS1 a iza njega je terminator transkripcije NOS. Plazmid također posjeduje gen za otpornost na ampicilin i karbenicilin Amp i bakterijsko izvoriste replikacije Col E1. U takav plazmidni vektor ugrađen je gen *TaMAB2* u okvir čitanja sa GFP-om na N-terminalnom kraju, tako da se prepisiju kao kimerni protein (slika 2). Takav plazmid sadrži 6803 parova baza.

Plazmidni vektor pH7WGR2-TUA6-RFP dobiven je ljubaznošću Dr. Van Damme. On sadrži *gen AtTUA-6* spojen sa genom za crveni fluorescencijski protein (RFP, od engl. Red Fluorescent Protein) pod promotorom CaMV 35S (Van Damme i sur. 2004).



Slika 2. Shema plazmidnog vektora pLNUG s ugrađenim genom *TaMAB2*.

2.1.4 Kemikalije

2.1.4.1 Početnice

Za određivanje primarnog slijeda nukleotida sam koristila:

- Ubi1: 5' CTG TTT CTT TTG TCG ATG C 3'

Za deleciju domene BTB sam koristila početnice BTB-out:

- BTB-out FW: 5' TTT GTG AAA GCA AGC TCT GTG AGA G 3'
- BTB-out REV: 5' TGT CTT CCA GCT GGT CTT GCA GCA GAC T 3'.

Za deleciju MATH domene sam koristila početnice MATH-out:

- MATH-out FW: 5' TCT GAC AGC AAT GGG AGC TTC ATT ATA CGG
TGT GTT CTC ACC GTG 3'
- MATH-out REV: 5' TCT CGA CGA GGT CTT GGG CAG GCA CTG
CCC ATG CCT AGC TGC AGC 3'

2.1.4.2 Enzimi

Upotrijebila sam slijedeće enzime:

Pfu Ultra polimeraza (Stratagene), T4 DNA ligaza (Fermentas), T4 DNA kinaza (Fermentas),

NotI (Fermentas), *BamHI* (Fermentas), *HindIII* (Fermentas)

2.1.4.3 Puferi

Prilikom elektroforeze u gelu agaroze upotrijebila sam:

- TAE pufer (pH 8): 40 mM Tris, 20 mM natrij acetat, 2mM EDTA
- Loading Buffer (Promega)
- GeneRuler DNA Ladder Mix (Promega).

Uz enzime sam po preporuci proizvođača upotrijebila pripadajuće pufere:

- R pufer uz *BamHI* (Fermentas)
- Pufer za Pfu polimerazu (Stratagene)
- Pufer za T4 DNA ligazu (Fermentas)

2.1.4.4 Komercijalni kompleti

Za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija upotrijebila sam komplete:

- Wizard Plus SV Minipreps (Promega)
- Midiprep (Quiagen)

Za čišćenje DNA iz gela agaroze upotrijebila sam komplet

- Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf)

2.1.4.5 Ostale kemikalije

Upotrijebila sam slijedeće kemikalije:

agar (Sigma), agaroza (Sigma), amonij-nitrat (Merck), bakto-triopton (Difco), bakar(II)sulfat-5-hidrat (Merck), borna kiselina (Merck), cink-sulfat-7-hidrat (Merck), etanol (Kemika), etidijev-bromid (Kemika), dNTP (10mM) (Invitrogen), Gel-rite (Sigma), glicerol (Kemika), glicin (Merck), isprani agar (Sigma), izopropanol (Merck), kalcij (II)-klorid (Merck), kalcij-klorid-2-hidrat (Merck), kalij-jodid (Merck), kalij-nitrat (Merck), karbenicilin (Sigma), klorovodična kiselina (Kemika), kobalt (II)-klorid-6-hidrat (Merck), magnezij-sulfat-7-hidrat (Merck), mangan-sulfat (Merck), m-inozitol (Sigma), natrij-EDTA (Merck), natrijev-hidoksiklorid (Kemika), natrijev-klorid (Kemika), natrij-molibdenat-2-hidrat (Merck), nikotinska kiselina (Sigma), octena kiselina (Kemika), spermidin (Sigma), suhi ekstrakt kvasca (Sigma), tris(hidroksimetil)-aminometan (Kemika), zlatni prah-0,6 μm (Borad), željezo(II)sulfat-7-hidrat (Merck).

2.2 Metode

2.2.1 Kultura stanica i tkiva

BMS stanice sam trajno uzgajala kao staničnu suspenziju u hranjivoj podlozi MS uz dodatak 2,4 D (1mg/l) u uvjetima tame, pri 26°C, uz stalnu vrtnju od 60-70 okr/min i uz presađivanje na svježju podlogu svakih 7 dana. Prilikom presađivanja na svježju hranjivu podlogu BMS stanice sam procjeđivala kroz najlonsku mrežicu s veličinom pora 100 µm i dodavala jednak volumen svježeg hranjivog medija za uzgoj stanične suspenzije.

Deset do šesnaest sati prije transformacije, BMS stanice sam procijedila kroz najlonsku mrežicu s veličinom pora 100 µm, a potom sam takvu suspenziju još jednom procijedila kroz najlonsku mrežicu veličine pora 50 µm. Tako procijeđene stanice iz mrežice sam jednolično razmazala po krutoj (0,8% gel-rite) osmotskoj podlozi MS u kojoj je saharoza bila zamijenjena dodatkom maltoze (239,61 g/l).

Slijedeće jutro, četiri sata prije mikroskopiranja, sam stanice prebacila u standardni hranjivi medij MS i uzgajala do mikroskopiranja u tami pri 26°C, na tresilici uz stalnu vrtnju od 60-70 okr/min.

Odječke luka veličine 1cm² sam prije postupka transformacije stavljala na osmotsku podlogu s udubljenom stranom, koja sadrži pokožicu, prema gore. Nakon transformacije komadiće luka sam prebacila na osnovnu podlogu MS preko noći sa udubljenom stranom prema dolje.

2.2.2 Stvaranje plazmida za prolaznu transformaciju biljnih stanica

2.2.2.1 Umnažanje lančanom reakcijom polimerazom

Za stvaranje plazmida koji omogućuje ekspresije kimernog proteina TaMAB2 i GFP-a s delecijom MATH (TaMAB2ΔMATH-GFP) ili BTB domene (TaMABΔBTB-GFP) sam koristila plazmid s genom *TaMAB2* unesenim u plazmidni vektor pLNUG-TaMAB2 (Sprunck i sur. 2005). Delecije sam napravila umnažanjem čitavog plazmida pLNUG-TaMAB2 polimerazom Pfu i početnicama koje se vežu uzvodno od 5' kraja i nizvodno od 3' kraja svake domene (slika 3). Reakcijska smjesa za stvaranje konstrukta TaMAB2ΔMATH-GFP i uvjeti obje reakcije PCR su opisani u tablicama 2 i 3.

TaMAB2	ATGGCCAGCACTCCACCGCTGCAGCTAGCCATGGCCAGTGCTGCCCAAGACCTCGTCGAGATGCTGACGCCGAGCGT	80
MATH-out	3' cgacgtcgatccgtaccggtcacggacgggttctggagcagctct	45
BTB-out		1
TaMAB2	CACCGCGACGCCACGATTTCCAGGTGACAACTACCGCTGCTCCACGGCATCGGCCGTCGAAAGCTCGTCAGCTCGACGG	160
MATH-out	— MATH —	45
BTB-out		1
TaMAB2	TCTTCAGCGTCGGCGGCTTTAACTGGAAGATCAGCTTCTTCGGGACGGCGTGAGACATGGCAGTTTGGCAACGCTTCG	240
MATH-out		45
BTB-out		1
TaMAB2	GCGTCTTTGAACTGCTTTAGCCCGAAAAGGATGTCAGAGCAGGGTTCACCTTGAACTTGCTGGACAAAAGTGGACACA	320
MATH-out		45
BTB-out		1
TaMAB2	GGTCACCAAGTTTGAGGAGATGAGTATACCTTCACCTCCGAATGCGTTTATCAGGCTATGCTCAGTTCATCGGGAAT	400
MATH-out		45
BTB-out		1
TaMAB2	CGTGGCTGAATCATGGTCTGACaGCARTGGAGCTTCATTATACGGTGCTTCTCACCGTCATCGGAGAACCCGCACT	480
MATH-out	TCTGACAGCARTGGAGCTTCATTATACGGTGCTTCTCACCGTG 3'	90
BTB-out		1
TaMAB2	GAGGTCAGAGGAGCCGTGTTCTTGTCGCCGCCGAGTCTGCAGACCCAGCTGGAGACATCGGTAGAGAGGAGAGG	560
MATH-out		90
BTB-out	3' tcagacgttctggtcgaccttctgt	25
TaMAB2	AGGAGATGTCACCTTCAGTGTGTGTGGCAGCTGTTCCATGCTCACAGATGTTTGCTGGCTGCAGATCTCCGGTTTCA	640
MATH-out		90
BTB-out	— BTB —	25
TaMAB2	AGGCAGAAATGTTTGGTCCCATGAAGGAGAGGCCAGCACAGCATCAGGTTGTGCACATGGAGCCCCAATCTTCAG	720
MATH-out		90
BTB-out		25
TaMAB2	GCGCTTCTCACTTTGTGTACACGATTTCCATGCCTCATGATGACACTCCAAAGATTGGACACGGCAAGCTTCAGCA	800
MATH-out		90
BTB-out		25
TaMAB2	CTTGCTAGTTGCTCGGATCAGTATGGACTAGATGGGTTATGGCGCTTTCGAAGCCAGCTCTGTGAGAGCATTGACG	880
MATH-out		90
BTB-out	TTTGTAAGCCAGCTCTGTGAGAG 3'	50
TaMAB2	TCCAGACTGTTCAGAGACATTGGTTTATGAGAGCAGACCCATTGCAGGATCTCCAGAGCTTGTGTGAGTTTCATG	960
MATH-out		90
BTB-out		50
TaMAB2	GCTCCACAGATGTTCTACAGCTGTTATGAAACTGATGGATTTAGCATTTGGTTGCGAGCTGTCCTCTGCTCATGAA	1040
MATH-out		90
BTB-out		50
TaMAB2	GGACATTTGGAAAAATTTCTCTTACTGACTAG	1074
MATH-out		90
BTB-out		50

Slika 3. Položaj vezanja početnica na krajevima domena koje su PCR reakcijom izbrisane iz gena. TaMAB2. FW početnice su prikazane velikim slovima i u smjeru 5'-3', a REV početnice su prikazane malim slovima i u smjeru 3'-5'. Crvena i plava linija prikazuju izbrisane dijelove gena; crvena je-MATH domena, a plava BTB domena.

Tablica 2. Reakcijska smjesa za stvaranje plazmida TaMAB2 Δ MATH-GFP lančanom reakcijom polimerazom.

Reagensi-radna otopina	Konačna koncentracija	Volumen (μ l)
diH ₂ O	-	19,5 μ l
Pfu pufer (10 \times)	1 \times	5 μ l
dNTP (2 mM)	800 μ M	20 μ l
početnica FW (100 nM)	4 nM	2 μ l
početnica REV (100 nM)	4 nM	2 μ l
PLNU-MAB2 GFP (10ng/ μ l)	0,1 ng / μ l	0,5 μ l
Pfu polimeraza (2,5 U/ μ l)*	1 U/50 μ l	1 μ l
Ukupni volumen:	-	50 μ l

*Pfu polimerazu sam dodavala posljednju i odmah nakon dodavanja stavljala reakcijsku smjesu u termoblok na početnu denaturaciju.

Tablica 3. Uvjeti reakcije PCR.

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	95 °C	3 min
40 ciklusa:		
Denaturacija	95 °C	2 min
Sparivanje početnica	70 °C	2 min
Produljivanje lanca DNA	70 °C	14 min
Završno produljivanje lanca DNA	70 °C	15 min

Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa je bila ohlađena na 4 °C.

2.2.2.2 Čišćenje PCR produkata elektroforezom

Produkte lančane reakcije polimerazom sam pročistila horizontalnom elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze, uronjenom u TAE pufer. Gel sam pripremila otapanjem agaroze u vrućem TAE puferu i nakon hlađenja dodala 2 μ l otopine etidij-bromida (0,5 μ g/ml) na 50 ml gela. Uzorke sam prije nanošenja pomiješala s 1/6 pufera za nanošenje s glicerolom i bojom (Loading buffer, Promega). Elektroforeza je trajala oko 60 minuta uz 5 V/cm gela.

DNA odgovarajuće veličine sam nakon elektroforeze izrezala skalpelom iz gela i pročistila DNA od agaroze uz pomoć kompleta Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf) po protokolu koji je priložen uz komplet

2.2.2.3 Ligacija produkta lančane reakcije polimerazom

2.2.2.3.1 Fosforilacija

Pročišćenom linearnom PCR produktu sam prije spajanja krajeva fosforilirala 5' krajeve T4 DNA kinazom (10U/ μ l), (30 min, 37 °C) u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala: 20 μ l DNA, 5 μ l pufera za T4 DNA ligazu i 0,5 μ l T4 DNA kinaze te bila dopunjena do 50 μ l vodom. Fosforilacija je neophodna jer 5' krajevi početnica nisu fosforilirani te takvi nisu supstrat za T4 DNA ligazu.

2.2.2.3.2 Ligacija

Fosforilirane krajeve sam spajala preko noći na 16 °C u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala: 9 μ l otopine DNA iz postupka fosforilacije i 1 μ l T4 DNA ligaze (1U/ μ l).

2.2.2.4 Transformacija bakterija

Plazmidnu DNA sam unosila u stanice soja JM109 E.coli (Promega), pripremljene za kemijsku transformaciju. Stanicama sam pri 4 °C dodavala 5 μ l ligacijske smjese. Nakon 30 min inkubacije na ledu smjesu sam izlagala temperaturi od 42 °C, 60 sek. Potom sam stanicama dodala 900 μ l tekućeg hranjivog medija LB (37 °C) i inkubirala bakterijsku suspenziju u horizontalno položenim epruvetama (60 min, 37 °C, 200 okr/min). Nakon inkubacije sam bakterijsku suspenziju razmazala na krutu LB podlogu s dodatkom karbenicilina za selekciju transformiranih kolonija i inkubirala 20 h, 37 °C.

Transformirane kolonije sam s ploče prenosila u 2 ml tekuće hranjive podloge LB s dodatkom karbenicilina doticanjem sterilnom čačkalicom i inkubirala 5h, 37 °C, 200 okr/min. Nakon 5 sati sam u bakterijsku suspenziju dodala još 3 ml istog medija i ostavila preko noći u istim uvjetima. Petrijeve ploče s hranjivim podlogama s transformiranim kolonijama sam nakon prenošenja kolonija pohranila na 2 °C.

2.2.2.5 Izolacija plazmidne DNA

Prije izolacije plazmidne DNA, 0,5 ml prekonoćne bakterijske suspenzije sam pomiješala s pola mililitra glicerola i spremila na -20 °C, najduže 6 mjeseci. Iz preostalih 4,5 ml prekonoćne bakterijske suspenzije sam izolirala plazmidnu DNA uz pomoć komercijalnog kompleta Wizard Plus SV Minipreps (Promega) po protokolu priloženom uz komplet.

Uspješnost postupka izolacije plazmidne DNA i količinu izolirane DNA sam provjerila elektroforezom alikvota izolirane DNA na gelu agaroze. Kako bih mogla provjeriti dužinu izoliranog plazmida, izdvojila sam alikvot od 2 µl pročišćene plazmidne DNA i linearizirala ga restrikcijom s enzimom *BamH1* (2 sata, 37 °C). U reakcijsku smjesu sam dodavala 2 µl plazmidne DNA (100 ng/ µl), 15,5 µl redestilirane sterilne vode, 2 µl 10×R pufera i 0,5 µl *BamH1* (10 U/µl). Reakcijska smjesa je tako sadržavala Pufer R (1×), miniprep plazmidne DNA 10 ng/ µl, *BamH1* (0,5 U/µl).

Nakon digestije sam provjerila veličinu izoliranog plazmida elektroforezom na gelu agaroze i usporedbom s biljekom veličine *Gene Ruler DNA Ladder mix* (Promega). Nukleotidni slijed obivenih plazmida određivan je u Laboratoriju za sekvenciranje Instituta Ruđer Bosković i detaljno analiziran prije njihove daljnje upotrebe.

2.2.2.6 Izolacija veće količine plazmidne DNA

Za postupak privremene transformacije biljnih stanica potrebna je otopina plazmidnog vektora što veće koncentracije, što se može dobiti iz najmanje 50 ml prekonoćne bakterijske suspenzije, pa sam kolonije koje su sadržavale dobar plazmid ponovno prenijela u 2 ml LB podloge s dodatkom karbenicilina, a nakon 8 sati sam 1 ml suspenzije prelila u 50 ml istog hranidbenog medija. Iz 50 ml prekonoćne bakterijske suspenzije sam izolirala plazmidnu DNA uz pomoć komercijalnog kompleta Midiprep (Quiagen) po protokolu priloženom uz komplet. Količinu dobivene DNA sam ponovno provjerila na agaroznom gelu i spektrofotometrijski pri valnoj dužini $\lambda=260$ nm

2.2.3 Transformacija biljnih stanica

Dobivene plazmidne vektore sam unosila u BMS stanice i epidermalne stanice pokožice luka uz pomoć sitnih čestica zlata, ispaljenih na tkivo pod visokim ubrzanjima u vakuumu, upotrebom uređaja *Particle gun (Bio-Rad) model PDS 100/He*

2.2.3.1 Priprema čestica zlata za postupak transformacije

Zlatni prah sam prije dodavanja DNA priredila ispiranjem i resuspendiranjem s etanolom i vodom. U 60 µg zlatnog praha (0,6 µm, Borad) dodala sam 1 ml 96% tnog etanola, 2 min snažno miješala (vorteks) te 1 min tretirala u ultrazvučnoj kupelji. Tako obrađenu smjesu zlata i etanola sam centrifugirala (10 sek, 10 000 okr/min). Zlatni talog sam nakon centrifugiranja još tri puta isprala uz pomoć 1 ml 96%tnog etanola, potom vorteksirala 2 min i centrifugirala (1 min 5000 okr/min).

Nakon tri ispiranja s etanolom zlatni talog sam isprala s 1 ml sterilne redestilirane vode, vorteksirala 2 min i centrifugirala (10 sek, 10 000 okr/min). Isprani talog sam ponovno resuspendirala u 1ml vode dvominutnim vorteksiranjem i rasporedila ga u Eppendorf epruvete, po 50 µl u svaku. Tako pripremljeno zlato bilo je spremno za nanošenje plazmidnog vektora za transformaciju, a moglo se čuvati smrznuto na -20 °C.

2.2.3.2 Priprava plazmida za transformaciju biljnih stanica

Nakon priprave zlatne suspenzije, česticama zlata sam dodavala plazmide za transformaciju biljnih stanica. 50 µl zlatne suspenzije u epruveti sam otopila na ledu. Prije nego što sam plazmide dodala zlatu, u poklopcu Eppendorf epruveta sam pomiješala 50 µl $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5 M), 20 µl spermidina (0,1 M), 5 µl plazmida pLNU-TaMAB2 Δ MATH-GFP (2,5 µg/µl) ili plazmida pLNU-TaMAB2 Δ BTB-GFP (2,5 µg/µl) i 5 µl plazmida pH7WGR2-TUA6-RFP (2,5 µg/µl).

Epruvete sam pažljivo zatvorila i naglo lupila prema dolje da bi se DNA, CaCl_2 i spermidin s poklopca istovremeno pomiješali sa zlatom. Smjesu sam odmah centrifugirala (30 sek, 12000 okr/min) i bacila supernatant. Zlatnom talogu sam dodala 250 µl 96%tnog etanola i resuspendirala ga struganjem po dnu epruvete. 7,5 µl tako pripravljene zlatne suspenzije s plazmidom sam nanosila na membranske nosače za transformaciju i pričekala da se osuši.

2.2.3.3 transformacija biljnih stanica plazmidima

Epidermu luka sam prije snimanja skinula s ljuske i prenijela ju na predmetnicu, dodala kap vode i pokrila pokrovnicom.

Za transformaciju sam upotrijebila uređaj *Particle gun (Bio-Rad) model PDS 100/He* i *rupture discs 1,100 psi*.

Stanice sam transformirala s 2-5 µg DNA u 7,5 µl zlatne suspenzije na membranskom nosaču uz upotrebu kontrolnih diskova koji pucaju pri tlaku helija koji uzrokuje ubrzanje zlatnih čestica s DNA, dostatno za prolaznu transformaciju biljnih stanica (*BioRad rupture disk 1100 psi*). Tijekom transformacije podtlak u uređaju je bio 28 mmHg, a udaljenost između membranskog nosača zlata, obavijenog plazmidnom DNA, i stanica 6 cm.

Nakon transformacije stanice sam inkubirala preko noći u mraku, a nakon toga su se mogle koristiti još dva dana za snimanje fluorescencije biljega.

2.2.4 Mikroskopiranje

Stanice sam promatrala i snimala invertnim fluorescentnim mikroskopom *Zeiss Axiovert 200* (Zeiss, Göttingen Germany). Za snimanje GFP biljega sam koristila set filtera 38 (GFP filter s ekscitacijom na 470-495 nm i emisijom na 525 nm). Za snimanje RFP biljega tubulina sam koristila set filtera 14 (Rodamin filter s ekscitacijom na 510-560 nm i emisijom na 590 nm). Za pobuđivanje fluorescentnih biljega sam koristila UV svjetiljku proizvođača *HBO 50/Ac*. Mikrofotografije sam snimala kamerom *DS-5Mc* proizvođača *Nikon* (Düsseldorf, Njemačka). Za spajanje snimljenih mikrofotografija sam koristila Nikonov program *Eclipse Net plug in MCF*.

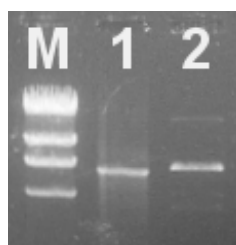
Stanice sam snimala i s konfokalnim scanning laserskim mikroskopom *Zeiss LSM510* (Carl Zeiss MicroImaging, Njemačka) Pri tome je fluorescencija GFPa bila ekscitirana na 488 nm, a RFPa na 543 nm uz pomoć argonskog lasera.

3 REZULTATI

3.1 Rezultati reakcije PCR

Reakcijom PCR, uz korištenje početnica MATH-out FW i MATH-out REV te kalupa plazmida pLNUG-TaMAB2, dobiven je PCR produkt pLNUG-TaMAB2 Δ MATH (slika 4), što se moglo vidjeti na agaroznom gelu usporedbom PCR produkta s plazmidom pLNUG-TaMAB2 digeriranim s *NotI*, te je tako uspješno načinjena delecija domene MATH.

PCR reakcijom, uz korištenje početnica BTB-out FW i BTB-out REV te istog kalupa nastao je produkt pLNUG-TaMAB2 Δ BTB. Usporedba veličina ovih PCR produkata je potvrdila da je PCR reakcijom načinjena delecija BTB domene (slika 5).



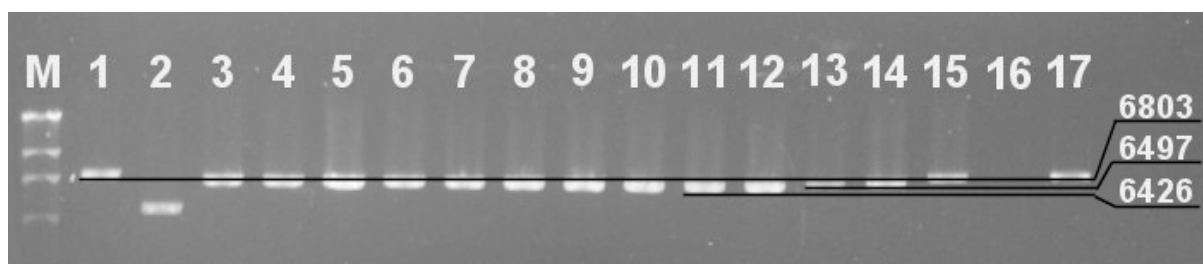
Slika 4. Produkt PCR reakcije MATH-out veličine 6426 parova baza (jažica 1) i TaMAB2, 6803 parova baza (jažica 2). Kao marker veličine sam koristila λ Hind 3, čija je treća vrpca velika 6557 parova baza.



Slika 5 Produkt PCR reakcije BTB-out veličine 6497 parova baza (jažica 4). Produkt PCR reakcije MATH-out, 6426 parova baza (jažica 1). Kao marker veličine sam koristila λ HE, čija je treća vrpca velika 5148 parova baza.

Da bih dobila plazmide s delecijama domena, PCR produkte TaMAB2 Δ MATH-GFP i TaMAB2 Δ BTB-GFP sam pročistila na agaroznom gelu, ligirala, te transformirala s njima bakterije *E.coli*. Iz Bakterija sam potom izolirala plazmide i odvajala alikvote od 2 μ l koje sam digerirala ih s *NotI*. Njihovom analizom na agaroznom gelu sam potvrdila uspješnost postupka ligacije i uspješno umnažanje u bakterijama (slika 6). Kako bih bolje odredila veličinu izoliranih plazmida TaMAB2 Δ MATH-GFP i TaMAB2 Δ BTB-GFP uspoređivala sam ih na agaroznom gelu

s lineariziranim plazmidom TaMAB2-GFP. Plazmidima koji su na agaroznom gelu pokazali odgovarajuću veličinu je određen primarni slijed nukleotida.



Slika 6. Plazmidi TaMAB2 Δ MATH-GFP (jažice 2 do 12) i TaMAB2 Δ BTB-GFP (jažice 13 do 15). Plazmid TaMAB2-GFP (jažice 1 i 17). Kao marker sam koristila λ *Hind III*, čija je treća vrpca velika 6557 parova baza. Plazmidi u jažicama 3 do 14 su bili tražene veličine.

3.2 Rezultati određivanja primarnog slijeda nukleotida

Detaljnijom analizom rezultata određivanja primarnog slijeda nukleinskih kiselina plazmida, uz pomoć programa BioEdit

(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

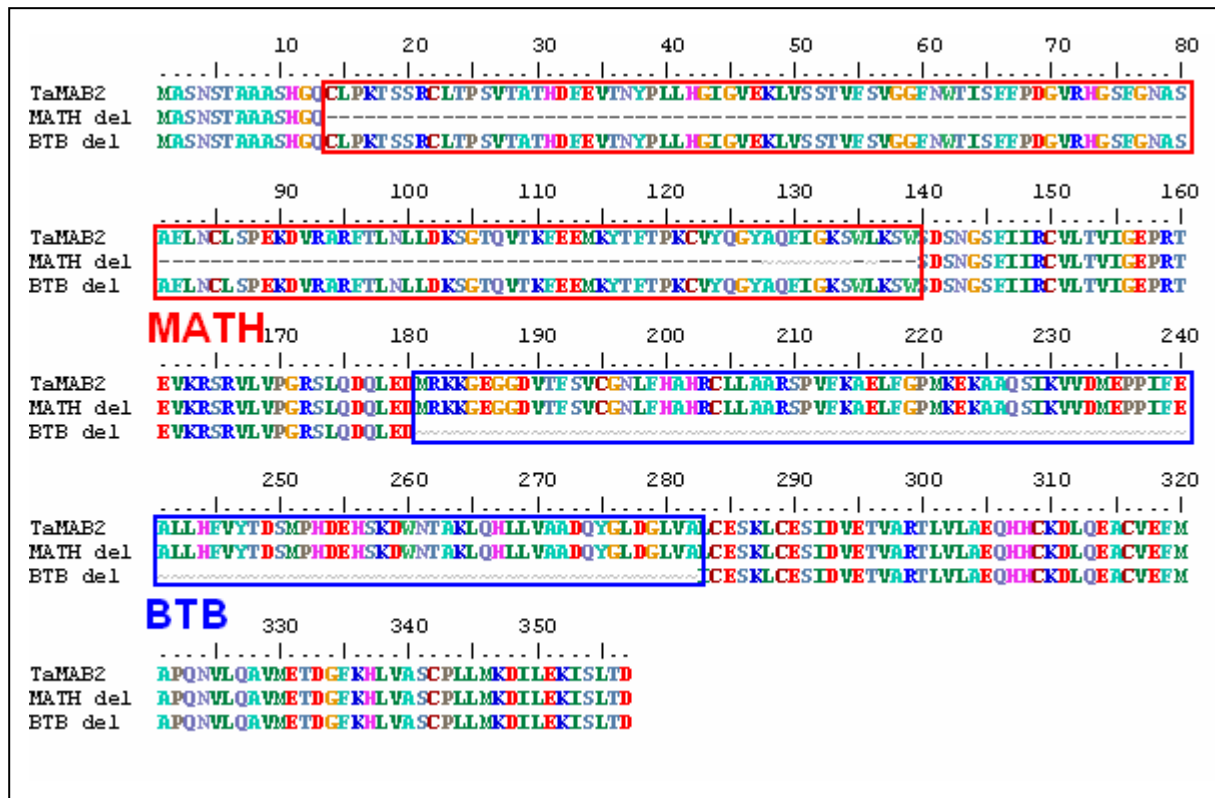
sam utvrdila da su metodom lančane reakcije polimerazom uspješno izbačeni željeni dijelovi gena TaMAB2 (slika 7). Pretvaranjem slijeda nukleinskih kiselina u slijed aminokiselina istim programom sam pokazala da delecijama nije promijenjen okvir čitanja (Slika 8).

3.3 Rezultati izolacije plazmida za postupak transformacije biljnih stanica

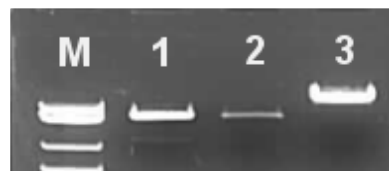
Za snimanje fluorescencije proteina obilježenih GFP-om je potrebna veća količina DNA pa sam u tu svrhu izolirala plazmide iz 500 ml bakterijske suspenzije kako bih dobila što više DNA. Analiza količine DNA na agaroznom gelu i spektrofotometrijski je pokazala da su plazmidi umnoženi u dovoljnoj količini (slika 9 i slika 10). Dobiveno je oko 2 μ gDNA/ μ l pLNUG-TaMAB2 Δ MATH i plazmida TuA6-RFP, dok je plazmid pLNUG-TaMAB2 Δ BTB izoliran u koncentraciji 1 μ gDNA/ μ l (slika 9). Drugom izolacijom plazmidne DNA je dobiveno oko 4 μ gDNA/ μ l plazmida TaMAB2 Δ BTB-GFP i plazmida TaMAB2-GFP (slika 10).

TaMAB2	ATGGCCAGCAACTCCACCGCTGCAGCTAGCCATGGCCAGTGCTGCCAAGACCTCGTCGAGATGCCTGACGCCGAGCGTCAACCGCGACG	90
MATH del	ATGGCCAGCAACTCCACCGCTGCAGCTAGCCATGGCCAGT	40
BTB del	ATGGCCAGCAACTCCACCGCTGCAGCTAGCCATGGCCAGTGCTGCCAAGACCTCGTCGAGATGCCTGACGCCGAGCGTCAACCGCGACG	90
TaMAB2	CACGATTTTCGAGGTGACAAACTACCCGCTGCTCCACGGCATCGGCGTCGAAAAGCTCGTCAGCTCGACGGTCTTCAGCGTCGGCGGGCTTT	180
MATH del		40
BTB del	CACGATTTTCGAGGTGACAAACTACCCGCTGCTCCACGGCATCGGCGTCGAAAAGCTCGTCAGCTCGACGGTCTTCAGCGTCGGCGGGCTTT	180
TaMAB2	AACTGGACGATCAGCTTCTTCCCAGCAGGCGTGAGACATGGCAGTTTCGGCAACGCTTCGGCGTTCCTTGAAGTGTCTTAGCCAGAAAAG	270
MATH del		40
BTB del	AACTGGACGATCAGCTTCTTCCCAGCAGGCGTGAGACATGGCAGTTTCGGCAACGCTTCGGCGTTCCTTGAAGTGTCTTAGCCAGAAAAG	270
TaMAB2	GATGTCAGAGCAAGGTTACCTTGAAGTTCTGGACAAAAGTGGAACACAGGTCACCAAGTTTGAGGAGATGAAGTATACCTTCACTCCG	360
MATH del		40
BTB del	GATGTCAGAGCAAGGTTACCTTGAAGTTCTGGACAAAAGTGGAACACAGGTCACCAAGTTTGAGGAGATGAAGTATACCTTCACTCCG	360
TaMAB2	AAATGCGTTTATCAGGGCTATGCTCAGTTTATCGGGAAATCGTGGCTGAAATCATgTCTGACaGCAATGGGAGCTTCATTATACGGTGT	450
MATH del		72
BTB del	AAATGCGTTTATCAGGGCTATGCTCAGTTTATCGGGAAATCGTGGCTGAAATCATgTCTGACaGCAATGGGAGCTTCATTATACGGTGT	450
TaMAB2	GTTCTCACCCTGATCGGAGAACCCCGCACTGAGGTCAAGAGGAGCCGTGTTCTTGTGCCGGGGCGGAGTCTGCAAGACCAGCTGGAAGAC	540
MATH del	GTTCTCACCCTGATCGGAGAACCCCGCACTGAGGTCAAGAGGAGCCGTGTTCTTGTGCCGGGGCGGAGTCTGCAAGACCAGCTGGAAGAC	162
BTB del	GTTCTCACCCTGATCGGAGAACCCCGCACTGAGGTCAAGAGGAGCCGTGTTCTTGTGCCGGGGCGGAGTCTGCAAGACCAGCTGGAAGAC	540
TaMAB2	ATGCGTAAGAAGGGGAGAAGGAGGAGATGTGACCTTTCAGTGTGTGTGGCAACCTGTTCCATGCTCACAGATGTTTGTGGCTGCAAGATCT	630
MATH del	ATGCGTAAGAAGGGGAGAAGGAGGAGATGTGACCTTTCAGTGTGTGTGGCAACCTGTTCCATGCTCACAGATGTTTGTGGCTGCAAGATCT	252
BTB del	AT	542
TaMAB2	CCGGTTTTCAAGGCAGAAATTGTCGGTCCCATGAAGGAGAAAGGCAGCACAGAGCATCAAGGTTGTCGACATGGAGCCCCCAATCTTCGAG	720
MATH del	CCGGTTTTCAAGGCAGAAATTGTCGGTCCCATGAAGGAGAAAGGCAGCACAGAGCATCAAGGTTGTCGACATGGAGCCCCCAATCTTCGAG	342
BTB del		542
TaMAB2	GCGCTTCTTCACTTTGTGTACACGGATTCCATGCCATGATGAACACTCCAAAGATTGGAACACGGCAAAGCTTCAGCACTTGCTAGTT	810
MATH del	GCGCTTCTTCACTTTGTGTACACGGATTCCATGCCATGATGAACACTCCAAAGATTGGAACACGGCAAAGCTTCAGCACTTGCTAGTT	432
BTB del		542
TaMAB2	GCTGCGGATCAGTATGGACTAGATGGGTTAGTGGCGCTTTGTGAAAGCAAGCTCTGTGAGAGCATTGACGTCGAGACTGTTGCAAGAACA	900
MATH del	GCTGCGGATCAGTATGGACTAGATGGGTTAGTGGCGCTTTGTGAAAGCAAGCTCTGTGAGAGCATTGACGTCGAGACTGTTGCAAGAACA	522
BTB del		594
TaMAB2	TTGGTTTTAGCAGAGCAGCACCATTGCAAGGATCTCCAAGAAGCTTGTGTTGAGTTTATGGCTCCACAGAATGTTCTACAAGCTGTTATG	990
MATH del	TTGGTTTTAGCAGAGCAGCACCATTGCAAGGATCTCCAAGAAGCTTGTGTTGAGTTTATGGCTCCACAGAATGTTCTACAAGCTGTTATG	612
BTB del	TTGGTTTTAGCAGAGCAGCACCATTGCAAGGATCTCCAAGAAGCTTGTGTTGAGTTTATGGCTCCACAGAATGTTCTACAAGCTGTTATG	684
TaMAB2	GAAACTGATGGATTTAAGCATTTGGTTGCGAGCTGTCTCTGCTCATGAAGGACATATTGGAAAAAATTTCTTACTGACTAG	1074
MATH del	GAAACTGATGGATTTAAGCATTTGGTTGCGAGCTGTCTCTGCTCATGAAGGACATATTGGAAAAAATTTCTTACTGACTAG	696
BTB del	GAAACTGATGGATTTAAGCATTTGGTTGCGAGCTGTCTCTGCTCATGAAGGACATATTGGAAAAAATTTCTTACTGACTAG	768

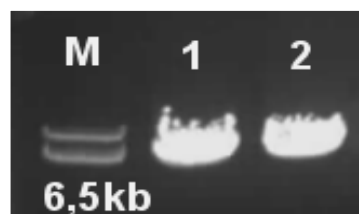
Slika 7. Rezultati sekvenciranja plazmida pLNUG-TaMAB2, pLNUG-TaMAB2ΔMATH (na slici MATH del) i pLNUG-TaMAB2ΔBTB (na slici BTB del) uz pomoć početnice Ubi 1. Rezultati pokazuju da su uz pomoć lančane reakcije polimerazom uspješno izbačeni ciljani dijelovi gena (sive valovite linije).



Slika 8. Analiza primarnog slijeda nukleinskih kiselina plazmida pokazuje da postupak stvaranja delecija PCR-om nije promijenio okvire čitanja te da izbačeni dijelovi gena kodiraju domene MATH ili BTB. Crveno uokvirena regija je domena MATH, a to je ujedno slijed izbačen iz plazmida pLNUG-TaMAB2 Δ MATH. Plavo uokvirena regija odgovara domeni BTB i prikazuje slijed izbačen iz pLNUG-TaMAB2 Δ BTB.



Slika 9. Analiza sadržaja plazmidne DNA. Plazmid pLNUG-TaMAB2 Δ MATH, 6426 pb (jažica 1), plazmid pLNUG-TaMAB2 Δ BTB, 6497 pb (jažica 2), plazmid TuA6-RFP, 12000 pb (jažica 3). DNA druge vrpce markera je velika 6500 pb.

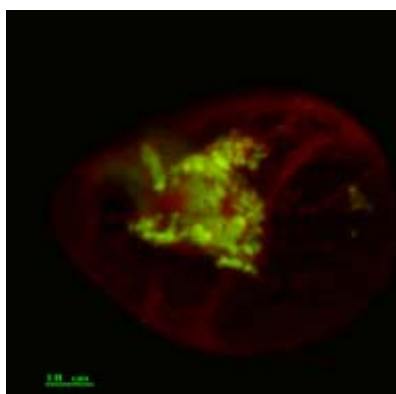


Slika 10. Analiza sadržaja plazmidne DNA. Plazmid TaMAB2 Δ BTB-GFP, 6452 pb (jažica 1), plazmid TaMAB2-GFP, 6803 pb (jažica 2).

3.4 Stanična lokalizacija proteina TaMAB2

Da bih ispitala utjecaj delecija domena MATH i BTB na karakterističnu polarnu i asimetričnu lokalizaciju proteina TaMAB2, biljne stanice sam transformirala plazmidima pLNUG-TaMAB2, pLNUG-TaMAB2 Δ MATH, pLNUG-TaMAB2 Δ BTB te plazmidom pH7WGR2-TUA6-RFP. Plazmid pH7WGR2-TUA6-RFP, čiji je produkt citoplazmatski protein tubulin- α , obilježen crvenim fluorescencijskim proteinom, služio kao pozitivna kontrola uspješnosti transformacije i položaja jezgre u stanicama. Mikroskopiranje je pokazalo da je transformacija plazmidima rezultirala stvaranjem kimernih proteina u stanici.

Kimerni protein TaMAB2 je bio uspješno obilježen zelenim fluorescencijskim proteinom, dok je protein tubulin- α bio uspješno obilježen crvenim fluorescencijskim proteinom. Kimerni protein TaMAB2, obilježen GFP-om, se u BMS stanicama raspoređivao polarno uz jezgrinu ovojnicu i stvarao karakterističnu nakupinu u obliku kape na jezgrinoj ovojnici. Protein tubulin α je bio difuzno raspoređen u citoplazmi (slika 11).

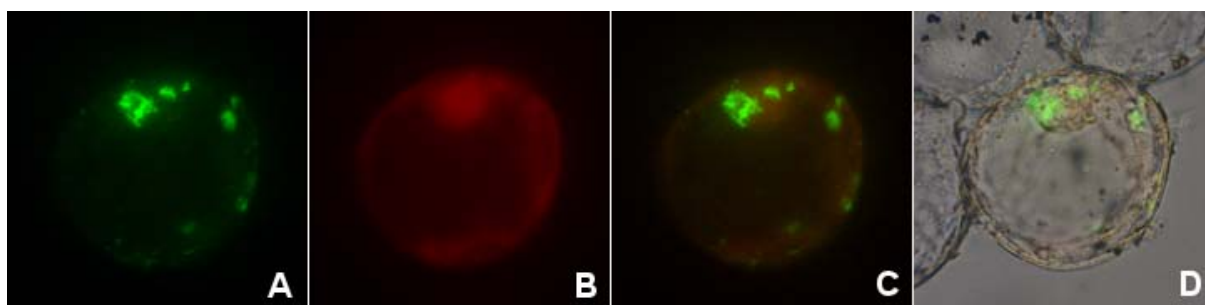


Slika 11. Lokalizacija kimernog protein TaMAB2 obilježen GFP-omu BMS stanici. Crvena boja prikazuje lokalizaciju tubulina α .

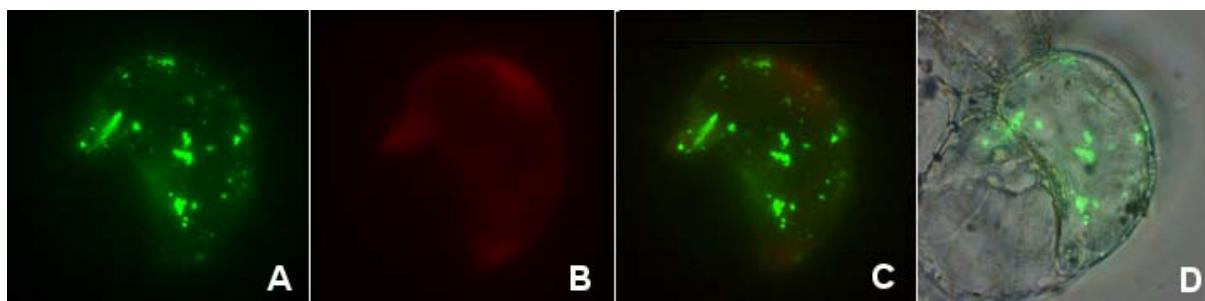
3.4.1 Stanična lokalizacija proteina TaMAB2 Δ MATH

Kimerni protein tubulin- α je u svim mikroskopiranim stanicama pokazao difuznu lokalizaciju u citoplazmi. Kimerni protein TaMAB2 Δ MATH-GFP s delecijom MATH domene je u stanicama pokazao tri različita načina lokalizacije (slike 12,13,14) no u niti jednom slučaju on nije bio polarno lokaliziran u obliku jedne nakupine uz jezgru, poput cijelog proteina TaMAB2-GFP (slika11).

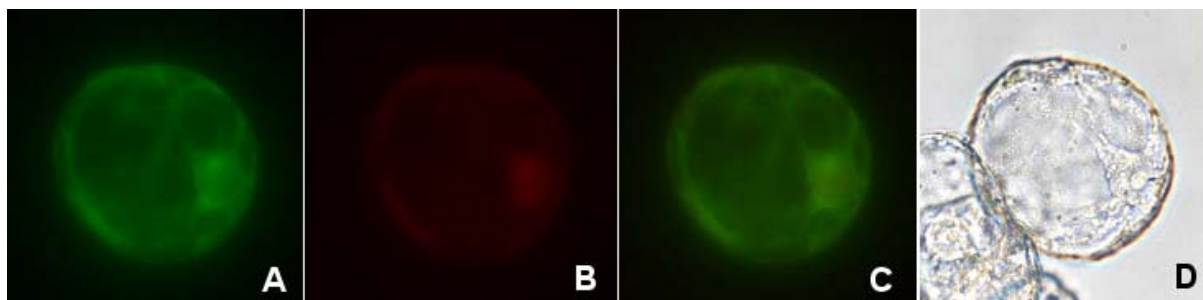
U 28% mikroskopiranih BMS stanica se je mogla vidjeti jedna veća nakupina proteina TaMAB2 Δ MATH-GFP uz jezgru i nekoliko manjih nakupina u citoplazmi (slika 12). U 54% mikroskopiranih BMS stanica protein TaMAB2 Δ MATH-GFP je stvarao nakupine koje nisu bile vezane uz jezgrinu ovojnicu (slika13), dok je 18% mikroskopiranih BMS stanica protein nije stvarao nakupine, nego je imao difuznu lokalizaciju u citoplazmi poput tubulina- α (slika14).



Slika 12. **A)** Lokalizacija TaMAB2 Δ MATH-GFP u BMS stanici u obliku jedne veće nakupine uz jezgru i nekoliko manjih u citoplazmi. **B)** Lokalizacija tubulina α -RFP u citoplazmi. **C)** Preklopljene slike lokalizacije TaMAB2 Δ MATH-GFP i tubulina α -RFP. **D)** Preklopljena slika stanice BMS, snimljene pod vidljivom svjetlošću i slika lokalizacije proteina TaMAB2 Δ MATH-GFP i tubulina α -RFP.

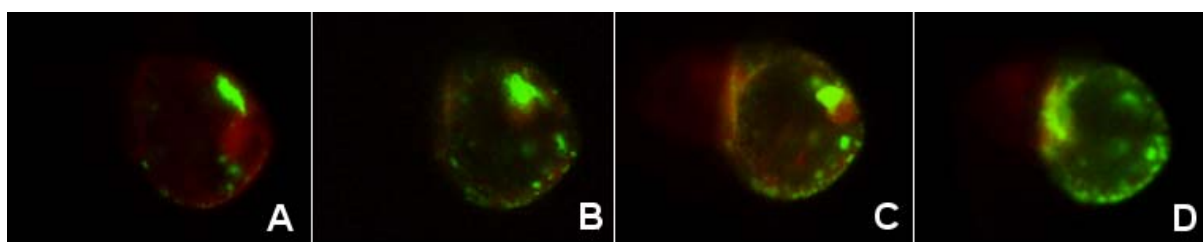


Slika 13. **A)** Lokalizacija TaMAB2 Δ MATH-GFP u BMS stanicama u obliku nekoliko manjih nakupina u citoplazmi. **B)** Lokalizacija tubulina α -RFP u citoplazmi. **C)** Preklopljene slike lokalizacije TaMAB2 Δ MATH-GFP i TUA6-RFP. **D)** Preklopljena slika stanice BMS, snimljene pod vidljivom svjetlošću, i slika lokalizacije proteina TaMAB2 Δ MATH-GFP i tubulina α -RFP.



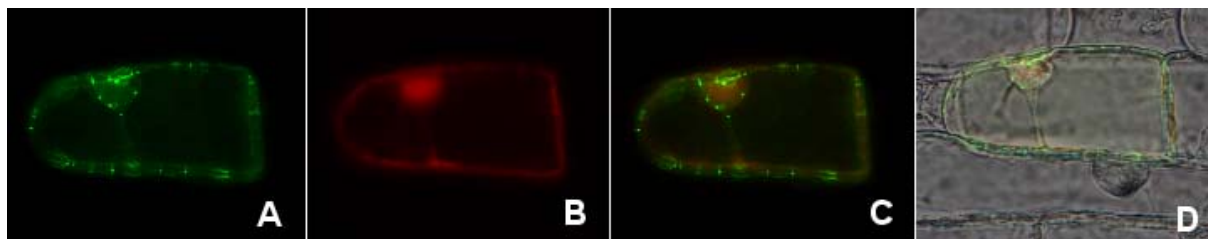
Slika 14. **A)** Difuzna lokalizacija TaMAB2ΔMATH-GFP u citoplazmi BMS stanica. **B)** Lokalizacija tubulina α-RFP. **C)** Preklopljena slika lokalizacije TaMAB2ΔMATH-GFP i TUA6-RFP. **D)** Preklopljena slika stanice BMS, snimljene pod vidljivom svjetlosti, i slika lokalizacije proteina TaMAB2ΔMATH-GFP i tubulina α-RFP.

Nekoliko BMS stanica transformirano plazmidom TaMAB2ΔMATH-GFP se dijelilo pa sam mogla pratiti promjenu lokalizacije proteina tijekom stanične diobe. On se prilikom prvog mikroskopiranja nalazio uz jezgrinu ovojnicu u obliku jedne veće nakupine (slika 15A). Nakon 20 sati mu se lokalizacija promijenila te je počeo s jezgrine ovojnice prelaziti u citoplazmu (slika 15 B) te mu se nakon 50 sati dodatno smanjila količina proteina uz jezgrinu ovojnicu, a povećala količina u citoplazmi (slika 15 C). 80 sati poslije prvog mikroskopiranja ga više nije bilo uz jezgrinu ovojnicu, nego je potpuno prešao u citoplazmu i počeo se skupljati uz staničnu periferiju između dvije stanice kćeri, na mjestu stvaranja fragmoplasta (slika 15 D). Kada se stanica podijelila protein TaMAB2ΔMATH-GFP se mogao vidjeti samo u većoj stanici kćerki.

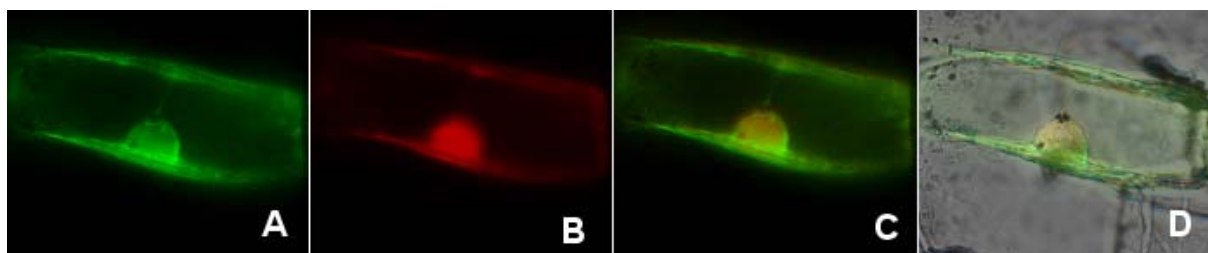


Slika 15 Preklopljena slika lokalizacije TaMAB2ΔMATH-GFP i tubulina α-RFP, opažena u staničnoj diobi BMS stanica. **A)** TaMAB2ΔMATH-GFP na jezgri prije diobe. **B)** Nakon 20 h se premiješta u citoplazmu. **C)** Nakon 50 h. **D)** Nakon 80 h se skuplja u području fragmoplasta.

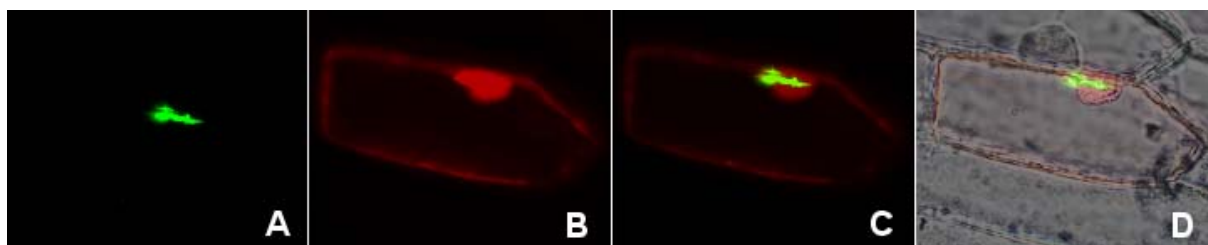
U 77% transformiranih stanica epiderme luka je kimerni protein TaMAB2 Δ MATH-GFP stvarao jednu nakupinu uz jezgru i nakupine u citoplazmi (slika 16), a u 15% stanica epiderme je bio difuzno raspoređen u citoplazmi (slika 17). Protein TaMAB2 Δ MATH-GFP je u 8% transformiranih stanica epiderme luka bio polarno smješten uz jezgrinu ovojnicu u obliku jedne nakupine, poput cijelog proteina TaMAB2-GFP (slika 19).



Slika 16. **A)** Lokalizacija TaMAB2 Δ MATH-GFP u stanicama epiderme luka u obliku nakupina uz jezgru i u citoplazmi. **B)** Lokalizacija tubulina α -RFP. **C)** Preklapljeni prikaz lokalizacije TaMAB2 Δ MATH-GFP i TUA6-RFP. **D)** Preklapljeni prikaz stanice epiderme luka, snimljene pod vidljivom svjetlošću, i slika lokalizacije proteina TaMAB2 Δ MATH-GFP i tubulina α -RFP.



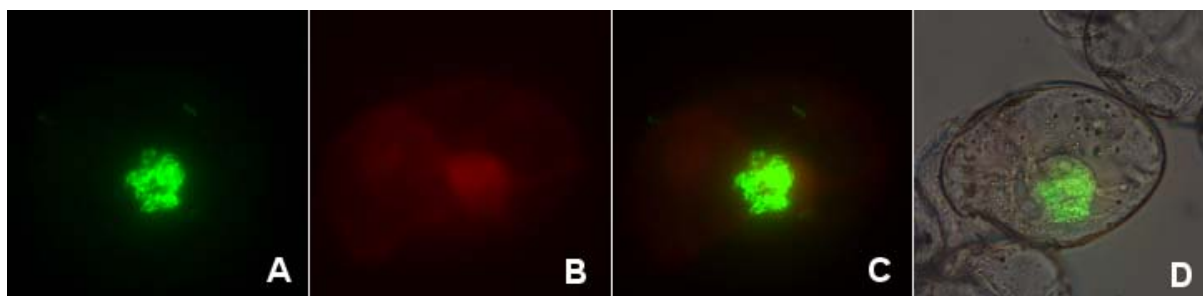
Slika 17. **A)** Difuzna lokalizacija proteina TaMAB2 Δ MATH-GFP u citoplazmi stanica epiderme luka. **B)** Difuzna lokalizacija tubulina α -RFP u citoplazmi. **C)** Preklapljeni prikaz lokalizacije TaMAB2 Δ MATH-GFP i tubulina α -RFP. **D)** Preklapljeni prikaz stanice epiderme luka, snimljene pod vidljivom svjetlošću, i slika lokalizacije proteina TaMAB2 Δ BTB-GFP i tubulina α -RFP.



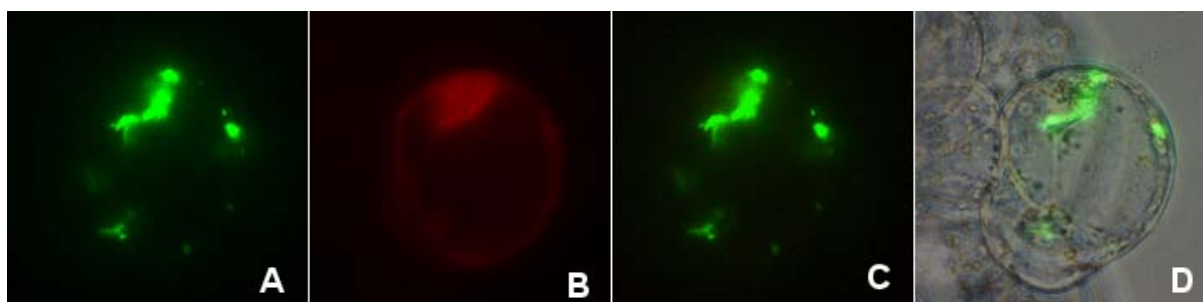
Slika 18. **A)** Polarna lokalizacija proteina TaMAB2 Δ MATH-GFP u stanicama epiderme luka uz jezgrinu ovojnicu. **B)** Lokalizacija tubulina α -RFP. **C)** Preklapljeni prikaz fluorescencije TaMAB2 Δ MATH-GFP i tubulina α -RFP. **D)** Preklapljeni prikaz stanice epiderme luka, snimljene pod vidljivom svjetlošću, i slika fluorescencije proteina TaMAB2 Δ BTB-GFP i tubulina α -RFP.

3.4.1 Stanična lokalizacija proteina TaMAB2 Δ BTB

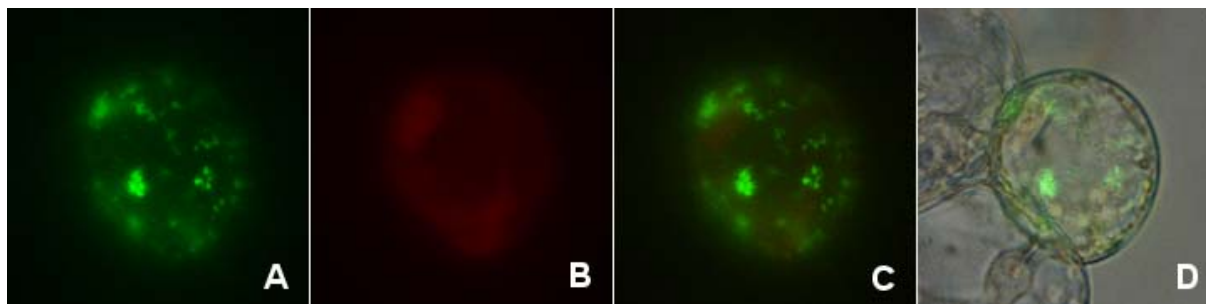
Kimerni protein TaMAB2 Δ BTB-GFP s delecijom BTB domene je u BMS stanicama Također pokazao tri različita načina lokalizacije (slike 19, 20, 21). U 26% BMS stanica je bio polarno lokaliziran poput TaMAB2-GFP u obliku jedne nakupine uz jezgru (Slika 19). U najvećem broju stanica, čak 70%, protein s ovom delecijom je stvarao jednu veću nakupinu uz jezgru i nekoliko manjih u citoplazmi (slika 20), dok je u samo 4% stanica protein stvarao nakupine samo u citoplazmi (slika 21). U niti jednoj BMS stanici, transformiranoj ovim plazmidom nije opažena difuzna lokalizacija u citoplazmi.



Slika 19. **A)** Polarna lokalizacija TaMAB2 Δ BTB-GFP u BMS stanicama, smještenog u obliku jedne veće nakupine uz jezgru. **B)** Lokalizacija tubulina α -RFP. **C)** Preklapljena slika lokalizacije TaMAB2 Δ BTB-GFP i tubulina α -RFP. **D)** Preklapljena slika stanice BMS, snimljene pod vidljivom svjetlošću, i slika lokalizacije proteina TaMAB2 Δ BTB-GFP i tubulina α -RFP.

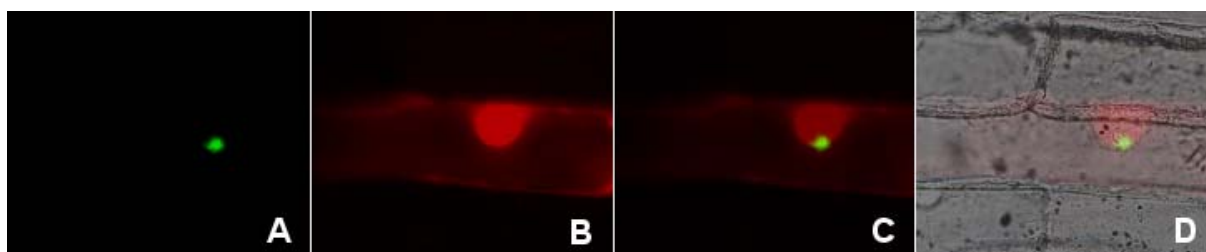


Slika 20. **A)** Lokalizacija TaMAB2 Δ MATH-GFP u BMS stanicama u obliku jedne veće nakupine uz jezgru i nekoliko manjih u citoplazmi. **B)** Lokalizacija tubulina α -RFP. **C)** Preklapljena slika lokalizacije TaMAB2 Δ BTB-GFP i TUA6-RFP. **D)** Preklapljena slika stanice BMS, snimljene pod vidljivom svjetlošću, i slika lokalizacije proteina TaMAB2 Δ BTB-GFP i tubulina α -RFP.

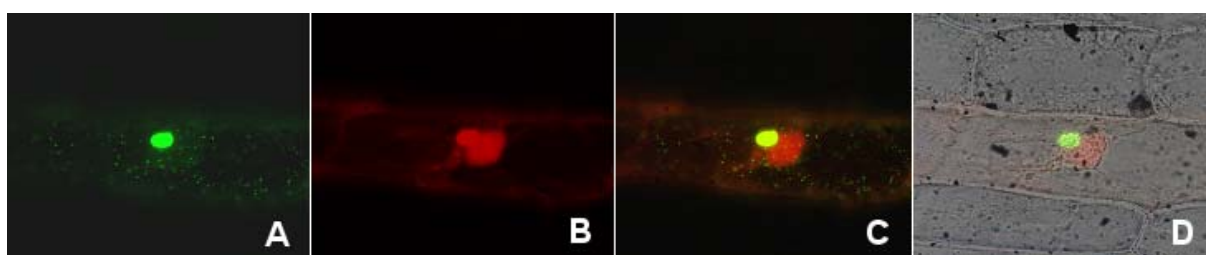


Slika 21. **A)** Lokalizacija proteina TaMAB2ΔMATH-GFP u BMS stanicama u obliku nekoliko manjih nakupina u citoplazmi. **B)** Lokalizacija tubulina α-RFP. **C)** Preklopljene slike lokalizacije TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP. **D)** Preklopljena slika stanice BMS, snimljene pod vidljivom svjetlosti, i slika lokalizacije proteina TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP.

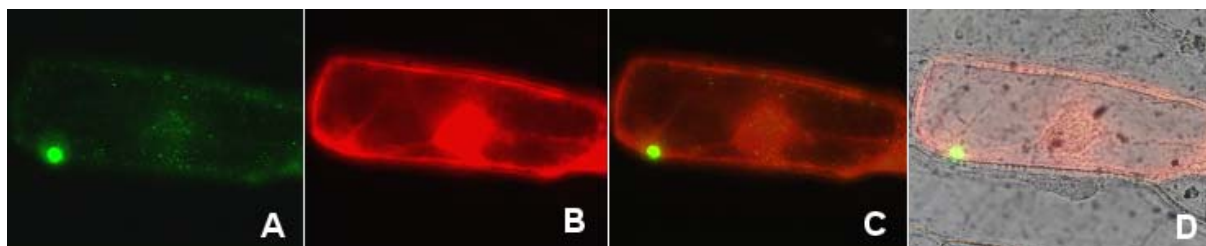
TaMAB2ΔBTB-GFP je u stanicama epiderme luka pokazao sličnu lokalizaciju kao i u BMS stanicama. U 27% stanica epiderme luka bio je polarno vezan uz jezgru u obliku jedne nakupine (slika 22). U 55% stanica epiderme luka kimerni protein s delecijom BTB domene je stvarao jednu nakupinu uz jezgru i manje u citoplazmi (slika 23), dok je u 18% snimljenih stanica luka stvarao nakupine samo u citoplazmi (slika 24). Kao i kod BMS stanica, u niti jednoj stanici luka TaMAB2ΔBTB-GFP nije imao difuznu lokalizaciju.



Slika 22. **A)** Lokalizacija proteina TaMAB2ΔBTB-GFP u stanicama epiderme luka, polarno smještenog u obliku jedne veće nakupine uz jezgru. **B)** Lokalizacija tubulina α-RFP. **C)** Preklopljene slike fluorescencije TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP. **D)** Preklopljena slika stanice epiderme luka, snimljene pod vidljivom svjetlosti, i slika lokalizacije proteina TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP u istoj stanici.



Slika 23. **A)** Lokalizacija proteina TaMAB2ΔBTB-GFP u stanicama epiderme luka u obliku jedne veće nakupine uz jezgru i nekoliko manjih u citoplazmi. **B)** Lokalizacija tubulina α-RFP. **C)** Preklopljena slika fluorescencije TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP. **D)** Preklopljena slika stanice epiderme luka, snimljene pod vidljivom svjetlosti, i slika lokalizacije proteina TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP.



Slika 24. **A)** Lokalizacija proteina TaMAB2ΔBTB-GFP u stanicama epiderme luka u obliku manjih nakupina u citoplazmi. **B)** Lokalizacija tubulina α-RFP. **C)** Preklopljena slika lokalizacije TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP. **D)** Preklopljena slika stanice epiderme luka, snimljene pod vidljivom svjetlosti, i slika fluorescencije proteina TaMAB2ΔBTB-GFP i tubulina α-RFP.

3.5 Rezultati bioinformatičke analize

3.5.1 Rezultati predviđanja sekundarne strukture

Programom PsiPRED (<http://www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, Mc Guffin i sur. 2000) sam analizirala sekvencu gena *TaMAB2* kako bih dobila predviđanje sekundarne strukture proteina. Predviđena je sekundarna struktura koja sadrži 13 β lanaca i 14 α zavojnica (slika 25). MATH domena sadrži 9 β lanaca i 2 α zavojnice, a BTB domena sadrži 3 β lanca i 6 α zavojnica.

Predviđanje sekundarnih struktura proteina TaMAB2ΔMATH je pokazalo da protein s delecijom MATH domene TaMAB2ΔMATH sadrži 12 α zavojnica i 4 β lanca (slika 27) pa zato delecija MATH dijela gena ne bi trebala utjecati na sekundarnu strukturu preostalog dijela proteina TaMAB2ΔMATH.

Za TaMAB2ΔBTB je predviđena sekundarna struktura koja se sastoji od 8 α zavojnica i 10 β lanaca (slika 26), što znači da ni ova delecije ne bi trebala utjecati na sekundarnu strukturu proteina TaMAB2ΔBTB.

40



3.5.2 Rezultati ClustalW analize

Programom M-Coffee (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/m-coffee/index.html>) sam
 spravnila, a potom obradila programom GeneDoc neke od *MAB* gena iz genoma miša,
C. Elegans, uročnjaka i žitarica riže, kukuruza i pšenice (slika 28). Uspoređeni su
 geni: *ZmMAB1* (GenBank Acc. No. EU344973), *TaMAB1* (GenBank Acc. No.
 FJ515275), *TaMAB2* (GenBank Acc. No. EU360467), *ZmMAB1-like* (GenBank Acc.
 No. EU974550), *ZmMAB1-like1* (GenBank Acc. No. EU974550), *ZmMAB1-like2*
 GenBank Acc. No BT037633), *ZmMAB1-like3* (GenBank Acc. No BT035122), geni iz
 riže (Rice Genome Annotation Project Database MSU Rice Locus Identifiers
 Numbers Os06g0251200, Os06g060668400 Os04g53410), *CeMEL26* (GenBank
 Acc. No. NP_492449), *AtBPM1* (*Arabidopsis* Genome Initiative identifiers
 At5g19000), *MmTDPOZ4* (GenBank Acc. No NP_997154).

Sravnjivanje je pokazalo da BTB domena pokazuje veću sličnost u primarnom slijedu aminokiselina od MATH domene.

4 RASPRAVA

U ovom radu sam ispitala utjecaj delecija i važnost domena MATH i BTB za lokalizaciju staničnog proteina pšenice TaMAB2. Delecije obiju domena su karakteristično utjecale na lokalizaciju proteina.

Smještaj proteina TaMAB2 uz jezgrinu ovojnicu i polaran raspored u obliku polumjeseca te ko-lokalizacija s mikrotubulima upućuju na njegovu povezanost sa strukturama u biljnoj stanici koje funkcioniraju kao organizacijski centri mikrotubula. TaMAB2 ima sličan raspored u stanici kao i protein AtGCP3, biljni homolog kvašćevog proteina Spc98p iz tjelešaca diobenog vretena. AtGCP3 se nalazi uz jezgrinu ovojnicu i ko-lokalizira s gama tubulinom u jezgri ovojnice i plazmalemi (Seltzer i sur. 2007).

Delecije domena MATH i BTB su na karakterističan način utjecale na sposobnost stvaranja nakupina proteina TaMAB2 i na sposobnost vezanja za jezgrinu ovojnicu. Proteini s delecijom MATH domene, kao i oni s delecijom BTB domene, nisu pokazali u svim stanicama jednak raspored, nego je njihova lokalizacija u stanicama varirala s različitom zastupljenošću raznih načina smještanja. U najvećem broju stanica protein TaMAB2 je zadržao tek djelomičnu sposobnost vezanja uz jezgru, što se moglo uočiti prisutnošću nakupina uz jezgrinu ovojnicu, ali i u citoplazmi te uz plazmalemu. Također su bili prisutni i drugi oblici smještanja. Tako se u nekim stanicama protein smještao polarno uz jezgru, poput cijelog proteina TaMAB2, dok je u drugima stvarao nakupine samo u citoplazmi i na periferiji stanice. U malom postotku stanica protein s delecijom je potpuno izgubio i sposobnost vezanja uz jezgrinu ovojnicu i sposobnost stvaranja nakupina, što se moglo uočiti potpuno difuznom lokalizacijom u citoplazmi.

Varijacije u rasporedu su karakteristične za bjelančevine čiji se raspored regulira i ovisi o staničnom ciklusu pa stoga i za proteine koji sudjeluju u nukleaciji mikrotubula i regulaciji dinamike tubulinskog citoskeleta tijekom staničnog ciklusa.

4.1 Važnost domene MATH za lokalizaciju proteina TaMAB2

Uslijed delecije domene BTB, pratili smo utjecaj same domene MATH na lokalizaciju proteina TaMAB2. U čak 96% mikroskopiranih transformiranih stanica BMS s delecijom domene BTB sam primijetila postojanje nakupina uz jezgru. U 70% BMS stanica su pored veće nakupine proteina uz jezgru postojale i manje nakupine u

citoplazmi, a protein s delecijom domene BTB se je u čak 26% snimljenih stanica raspoređivao kao cijeli protein TaMAB2. Očito je da je MATH domena bitno pridonijela ovakvoj lokalizaciji.

U 82% transformiranih stanica epiderme luka sam primijetila da je delecija uzrokovala nakupljanje uz jezgru. U 55% stanica luka su se pored veće nakupine uz jezgru nalazile i manje nakupine proteina u citoplazmi, dok je lokalizacija poput cijelog TaMAB2 proteina bila zamijećena u 27% transformiranih stanica epiderme luka.

Delecija MATH domene imala je snažniji utjecaj na vezanje proteina TaMAB2 uz jezgru jer u samo 28% BMS stanica protein TaMAB2 sa BTB domenom, zadržao djelomičnu sposobnost vezanja uz jezgru. To se moglo uočiti prisutnošću veće nakupine uz jezgru, ali i manjih nakupina u citoplazmi i uz plazmalemu. U niti jednoj stanici TaMAB bez MATH domene se nije smještao polarno, kao cijeli protein s obje domene.

Iako se točna uloga MATH domene ne zna, moji rezultati se slažu s teorijama da ona funkcionira kao vezna domena za supstrat proteina TaMAB2, koji su se u slučaju funkcije proteina TaMAB2, nalazi uz jezgrinu ovojnica. Analizom genoma vrste *C.elegans* je dokazano postojanje pozitivnog selekcijskog pritiska na proteinske adaptore za ubikvitinske ligaze, a među njima posebno na MATH-BTB proteine i mjesta kojima one vežu supstrat. Takav pritisak djeluje na evoluciju MATH domena, dok su BTB domene, koje se vežu za kulin3, u odnosu na MATH domene relativno nepromijenjene (Thomas 2006). Rezultati bioinformatičke analize programom T-Coffee su pokazali da su MATH domene MAB proteina iz različitih organizama vrlo različite u sekvenci, dok je u BTB domenama postojala konsensus sekvenca i veća sličnost. Takvi rezultati se također slažu s prijašnjim bioinformatičkim istraživanjima (Thomas 2006).

Iznenadujuća sličnost u razvoju obitelji MATH-BTB proteina je također zamijećena u genomima riže. Dok je većina biljnih gena koje sadrže BTB domenu konstantna i prisutna u malom broju, postoji veliko povećavanje u broju i različitosti *MATH-BTB* gena riže. Posebno valja istaknuti da je broj *MATH-BTB* gena u riže 69, što je veliko povećanje u odnosu na samo četiri puta manji genom uročnjaka, koji kodira gene za samo šest MATH-BTB proteina (Gingereich i sur.2007). Nadalje, različitost u slijedu MATH domene rižinih MAB proteina ukazuje na funkcionalnu specijalizaciju MATH domene usmjerenu na prepoznavanje većeg broja supstrata. U

prilog tomu ide i činjenica da su geni koji kodiraju MAB proteine pšenice i ostalih jednosupnica vrlo precizno regulirani za vrijeme razvoja te je aktivnost proteina kontrolirana i tkivno i vremenski specifično (Leljak.-Levanić neobjavljeni rad).

Kako uslijed delecije BTB domene protein nije izgubio sposobnost stvaranja nakupina, jer ni u jednoj stanici BMS, niti u stanicama epiderme luka nije zabilježena difuzna lokalizacija u citoplazmi, moguće je da MATH domena može stvarati trimere, kao MATH domena TRAFa, ili tetramere, kao MATH domena meprina (Sunnerhagen 2002), iako sposobnost stvaranja nakupina može ovisiti i samo o vezanju uz druge proteine.

4.2 Važnost domene BTB za lokalizaciju proteina TaMAB2

Delecijom domene MATH mogli smo pratiti utjecaj same domene BTB na lokalizaciju proteina TaMAB2 u stanicama BMS i u stanicama epiderme luka. Delecija MATH domene je u BMS stanicama više utjecala na promjenu sposobnosti vezanje proteina TaMAB2 uz jezgru nego na stvaranje nakupina, jer sposobnost stvaranja nakupina je bila zadržana u čak u 82% BMS stanica, što se je moglo opaziti stvaranjem nakupina uz jezgru i u citoplazmi u 28% stanica, i stvaranjem nakupina samo u citoplazmi u 54% stanica.

U 85% stanica epiderme luka s proteinom koji je sadržavao samo BTB domenu je zadržana sposobnost stvaranja nakupina. Sposobnost djelomičnog vezanja uz jezgru je bila zadržana tek u 28% stanica BMS, što se moglo vidjeti prisutnošću nakupina proteina uz jezgru, ali i u citoplazmi i uz periferne mikrotubule. Ovom delecijom nisam u niti jednoj stanici BMS ni u stanicama epiderme luka uočila karakterističnu polarnu lokalizaciju proteina uz jezgru.

Promjena lokalizacije proteina TaMAB2 s delecijom MATH domene, koju sam opazila u stanicama, je u skladu s objavljenim rezultatima i ovisila je o veznim sposobnostima BTB domene. Ova domena ima sposobnost dimerizacije i tako utječe na stvaranje homodimera proteina koji ju sadrže, ali isto tako ima sposobnost spajanja s BTB domenama ostalih, različitih proteina. Za sposobnost stvaranja dimera su odgovorni lanac $\beta 1$ s N kraja jedne BTB domene prve podjedinice dimera i β lanac, koji se nalazi u hidrofobnom utoru BTB domene druge podjedinice dimera, a

iste strukture su konzervirane u BTB domenama različitih proteina (Farid Ahmad i sur.1998).

Lokalizacija proteina TaMAB2, koji sadrži samo BTB domenu, uz jezgrinu ovojnicu, uz plazmalemu i staničnu periferiju se može objasniti vezanjem BTB domene za druge BTB proteine koji se tamo nalaze, pa čak i za nativni kukuruzni homolog proteina TaMAB2. BTB domena MAB proteina uročnjaka se veže s kulinom 3 AtCULa (CAC87120) i AtCUL3b (NP_723908), koji su podjedinice kompleksa ubikvitinske ligaze E3. Uloga ligaza E3 je prijenos ubikvitina na supstrat i upućivanje obilježenog proteina u razgradnju na proteasomu 26 S (Laney i Hochstrasser 1999), a BTB domene mnogih proteina služe ubikvitinskim kigazama E3 kao proteinski adaptori za prepoznavanje različitih supstrata.

U stanicama duhana 2YT je opaženo nakupljanje proteasoma 26 S uz jezgrinu ovojnicu, zatim u diobenim vretenima, prijeprofaznoj vrpci i fragmoplastima (Yanagawa i sur. 2002) pa se može zaključiti kako je vezanje BTB domene za kulin i proteasom 26 S mogući uzrok vezanja BTB domene za jezgru, ali i za njihovu nakupljanje u prijeprofaznoj vrpci i rasprotranjenost u citoplazmi.

Ovakve varijacije u smještaju mogle bi biti povezane sa staničnim ciklusom te ulogom i lokalizacijom 26 proteasoma u regulaciji staničnog ciklusa.

Kako je protein TaMAB2 obilježen GFP-om i u stanicama epiderme luka imao sličan raspored kao i u BMS stanicama, može se zaključiti da je njegova uloga među jednosupnicama konzervirana te da u različitim vrstama postoji jedinstven mehanizam uspostavljanja polarnosti i asimetrije uz pomoć razgradnje proteina.

4.3 Promjena lokalizacije TaMAB2 u mitozu

Neke od promatranih stanica BMS su bile u mitozu pa sam mogla pratiti promjenu rasporeda proteina TaMAB2 s BTB domenom tokom same diobe. Početna polarna lokalizacija uz jezgrinu ovojnicu se postupno mijenjala, a protein je postupno sve više prelazio u obliku manjih nakupina s jezgrine ovojnice u citoplazmu. Nakupine su se skupljale uz staničnu periferiju, a potom i uz fragmoplast, na kojem se mogla vidjeti kolokalizacija tubulina i TaMAB2.

Promjene u rasporedu proteina TaMAB2 za vrijeme staničnog ciklusa se slažu s opaženim promjenama u lokalizaciji 26 S proteasoma stanicama duhana 2YT.

Promjene u rasporedu proteasoma su povezane sa staničnim ciklusom, kao i s važnošću proteasoma za prelazak iz mitoze u G1 fazu. U 2YT stanicama u interfazi proteasom 26 s se nalazi uz jezgrinu ovojnicu, krajem interfaze u fazi G2 je dokazano njegovo skupljanje uz prijeprofaznu vrpču, njegova lokalizacija uz prijeprofaznu vrpču je osobito važna prilikom njene razgradnje, koja prethodi mitozu. Ako se u ovom stupnju staničnog ciklusa inhibira aktivnost proteasoma 26 S, ne dolazi do razgradnje prijeprofazne vrpce i stanica ne može započeti mitozu. U mitozu se proteasom 26 s nalazi uz diobeno vreteno, a krajem mitoze se počinje skupljati uz fragmoplast. Inhibicijom proteasoma u ovoj fazi staničnog ciklusa ne dolazi do razgradnje fragmoplasta pa stanica ne može izaći iz mitoze i započeti fazu G1 (Yanagawa i sur. 2002).

TaMAB2, sa samo BTB domenom, je nakon diobe bio naslijeđen samo u većoj stanici, zbog čega se može pretpostaviti da postoje mehanizmi asimetričnog raspoređivanja, bilo povezanošću s mikrotubulima, bilo razgradnjom u jednoj od stanica kćeri. Ako je TaMAB2 prisutan samo u jednoj kćeri, moguće je njegovo sudjelovanje u određivanju asimetrije i diferencijacije, jer je polaran raspored faktora asimetrije jedan je od glavnih pretpostavki da on utječe na različitu sudbinu stanica kćeri (Gonczy 2008).

Na temelju funkcije MATH domene u MATH-BTB proteinu MEL26 vrste *C.elegans* može se zaključiti da je ona odgovorna za prepoznavanje i povezivanje sa supstratom na jezgri ovojnice koji je predviđen za razgradnju na proteasomu 26 S, koji sudjeluje u regulaciji mikrotubula, dok je za povezivanje supstrata s proteasomom preko MATH domene neophodna domena BTB. Prisutnost proteina TaMAB2 i 26 S proteasoma uz strukture koje imaju ulogu organizacijskih centara mikrotubula u biljnim stanicama također se slaže s ovom pretpostavkom.

Polarni raspored proteina TaMAB2 i njegovo asimetrično nasljeđivanje u stanice kćeri, te interakcija preko BTB domene s kulinima 3 upućuje na njegovu ulogu u uspostavljanju asimetrične diobe prilikom prve diobe zigote pomoću asimetrične razgradnje proteina, koji bi mogli sudjelovati u diferencijaciji potomaka zigote.

Asimetrična razgradnja proteina sudjeluje u uspostavljanju polarnosti i određivanju različite sudbine stanica kćeri prilikom diferencijacije u nekim dobro istraženim primjerima kao što je dioba zigote vrste *C.elegans* pa nije isključena njezina važnost prilikom asimetrične diobe zigote u biljka. U tom procesu su osobito

važni mikrotubuli, bez kojih proces asimetričnog raspoređivanja čimbenika diferencijacije uopće ne bi bio moguć. Stoga ne čudi povezanost lokalizacije proteina TaMAB2 sa strukturama koje imaju ulogu organizacijskih centara mikrotubula u biljnoj stanici, kao što su jezgrina ovojnica, prijeprofazna vrpca, stanična periferija i fragmoplast. Prolazak kroz stanični ciklus, s kojim je povezano uspostavljanje polarnosti i asimetrije, upravo ovisi o ispravnoj i preciznoj vremenskoj i prostornoj regulaciji razgradnje istih struktura.

Iako je očita povezanost organizacijskih centara mikrotubula i određivanja stanične polarnosti prilikom prve asimetrične diobe zigote, ipak nije jasna točna veza organizacijskih centara mikrotubula, razgradnje proteina na proteasomu i proteina TaMAB2, kao što je ona utvrđena za MATH-BTB protein MEL26 *C. elegans*. Da bi se razjasnila veza organizacijskih centara mikrotubula i uloge asimetrične razgradnje proteina prilikom prve diobe zigote, potrebno je utvrditi ostale proteine s kojima se veže TaMAB2 preko svoje domene MATH i tako utječe na njihovu razgradnju. Također je potrebno utvrditi mehanizam prepoznavanja supstrata za razgradnju te mehanizam regulacije aktivnosti samog proteina TaMAB2.

5 ZAKLJUČAK

Delecija MATH domene je snažno utjecala na staničnu lokalizaciju proteina TaMAB2, mijenjajući njegov karakteristični raspored u svim mikroskopiranim stanicama. U niti jednoj stanici BMS TaMAB2 bez MATH domene se nije smještao polarno kao cijeli protein s obje domene.

Delecija je najviše je promijenila njegovu sposobnost vezanja uz jezgrinu ovojnica. Protein s delecijom je u 82% stanica izgubio sposobnost vezanja uz jezgrinu ovojnica, što se moglo vidjeti kao difuzna lokalizacija u citoplazmi ili prisutnost nakupina u citoplazmi. U 28% mikroskopiranih stanica je ta sposobnost vezana uz jezgrinu ovojnica bila promijenjena, što se moglo uočiti prisutnošću manjih nakupina proteina uz jezgrinu ovojnica, ali i u citoplazmi i uz staničnu periferiju.

Delecija MATH domene je također promijenila sposobnost stvaranja nakupina proteina TaMAB2 u 18% mikroskopiranih BMS stanica, u kojima je protein bio difuzno raspoređen u citoplazmi.

Delecija domene BTB je također utjecala na lokalizaciju proteina TaMAB2, ali ne tako snažno kao MATH domena, jer se je u 26% snimljenih stanica protein s delecijom BTB domene raspoređivao kao cijeli TaMAB protein.

Delecija domene BTB je također utjecala na promjenu vezanja proteina uz jezgrinu ovojnica, ali manje nego delecija MATH domene, što se je moglo uočiti u 4% BMS stanica, u kojima se nakupine proteina uopće nisu vezale uz jezgrinu ovojnica, i u 70% BMS stanica u kojima je sposobnost vezanja uz jezgrinu ovojnica bila tek djelomično zadržana.

Delecija domene BTB nije promijenila sposobnost stvaranja nakupina proteina TaMAB2.

Lokalizacija TaMAB2 proteina s delecijom domene MATH se mijenjala kroz mitozu. U interfazi se nalazio uz jezgru, u obliku jedne velike nakupine, i nekoliko manjih nakupina u citoplazmi. U mitozu je postupno prelazio iz jezgrine uvojnice u citoplazmu u obliku manjih nakupina. Nakon što je potpuno prešao u citoplazmu, počeo se skupljati uz fragmoplast.

TaMAB2, sa samo BTB domenom, je nakon diobe bio naslijeđen samo u većoj stanici.

6 LITERATURA

ANDERSEN JS 2003 Proteomic characterisation of the human centrosome by protein correlation profiling, *Nature* 462: 570-574

BOBOLA N, JANSEN R-P, SHIN TH, NASMITH K 1996 Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84: 699-709

BOWERMAN B, TAX FE, THOMAS JT, PRIESS JR 1992 Identification of cell interactions involved in development of the bilaterally symmetrical intestinal valve cells during embryogenesis in *C. elegans*. *Development* 116: 1113-22

BRANDIZZI F, IRONS SL, EVANS DE 2004 The plant nuclear envelope: new prospects for poorly understood structure. *New Phytologist* 163: 227-246

CHANT J 1996 Septin scaffolds and cleavage planes in *Saccharomyces*. *Cell* 84: 187-90

CHANT J, MISCHKE M, MITCHELL E, HERSKOWITZ I, PRINGLE JR 1995 Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *J cell Biol.* 129: 767-78

EADY C, LINDSEY K, TWELL D, 1995 The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specification transcription and generative cell differentiation. *Plant Cell* 7: 65-74

GHO M, SCHWEISHGUTH F 1997 Asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 393: 178-81

GODT D, COULDERC JL, CRAMTON SE, LASKI FA 1993 Pattern formation in the limbs of *Drosophila*: bric a brack is expressed in both a gradient and a wave-like pattern and is required for specification and proper segmentation of tarsus. *Development* 119: 799-812

HAECKER A, GROSS-HARDT R, GEIGES B, SARKAR A, BREUNINGER H, HERRMANN M, LAUX T 2003 Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131: 657-668

HEIDSTRA R 2007 Macieira-Coelho A (eds) Progress in Molecular and Subcellular Biology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str 1-32

HORN M, COLLINGRO A, SCHMITZ-ESSER S, BEIER CL, PURKHOLD U 2004 Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science* 304: 728-730

KNOBLICH JA, JAN LY, JAN YN 1997 The N terminus of *Drosophila* Numb and Prospero during cell division. *Nature* 377: 642-26

KUMAGAI F, NAGATA T, YAHARA N, MORIYAMA Y, HORIO T, NAOI K, HASHIMOTO T, MURATA T, HASEZAWA S 2003 γ - Tubulin distribution during cortical microtubule reorganization at the M/G interface in tobacco BY-2 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 82: 43-51

KUMLEHN J, LÖRZ H, KRANZ 1999 Monitoring individual development of isolated wheat zygotes: a novel approach to study embryogenesis. *Protoplasma* 208: 156-162

LAMBERT AM, LLOYD CW 1994 The higher plant microtubule cycle. *In* Microtubules, ed. Hyams JS i Lloyd CW, Wiley-Liss inc. New York 325-341

LLOYD CW, 1991 Cytoskeletal elements of the phragmosome establish the division plane in vacuolated higher plant cells. *In The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form.* ed. CW Lloyd, 245-57 London: Academic

LONG RM, SINGER RH, MENG X, GONZALES I, NASMYTH K, JANSEN R-P 1997 Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* RNA. *Science* 277: 383-87

LÜDERS J, STEARNS T 2007 Microtubule organizing centres: a re-evaluation, *Nature* 8: 161-168

McGUFFIN LJ, BRYSON K, JONES T 2000 The PsiPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16:404-405

DBMURATA T, WADA M 1993 Effects of centrifugation on preprophase band formation in *Adiantum protonemata*. *Planta* 183: 391-98

PEREZ-TORRADO R, YAMADA D, DEFOSSES PA 2006 Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain. *BioEssays* 28: 1194-1202

RHYU MS, JAN LY, JAN YN 1994 Asymmetric distribution of Numb protein during division of the sensory organ precursors cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76: 477-91

SCHERES B, BENFEY PN 1999 Asymmetric cell division in plants. *Physiol Plant* 50: 505-37

SPRUNCK S, BAUMAN U, EDWARDS K, LANGRIDGE P, DRESSELHAUS T 2005 The transcript composition of egg cells changes significantly following fertilisation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Plant Journal* 41: 660-672

STOGIOS PJ, DOWNS GS, JAUHAL JJS, NANDRA SK, PRIVE GG 2005 Sequence and structural analysis of BTB proteins. *Gen. Biol.* 6: R82

STOPPIN V, LAMBERT AM, VANTARD M 1996 Plant microtubule-associated proteins (MAPs) affect microtubule nucleation and growth at plant nuclei and mammalian centrosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 69: 11-23

TWELL D, PARK SK, LALANNE E 1998 Asymmetric division and cell fate determination in developing pollen. *Trends Genet.*

UREN AG, VAUX DL 1996 TRAF proteins and meprins share a conserved domain. *Trends Biochem. Sci.* 21: 244-245

VAN DAMME, D., VAN POUCKE, K., BOUTANT, E., RITZENTHALER, C., INZE, D., AND GEELLEN, D. (2004). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* 136, 3956-3967.

VERMA DPS 2001 Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52: 751-784

VOGEL C, BASHTON M, KERRISON ND, CHOTHIA C, TEICHMANN SA, 2004 Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 208-216

WHITE J, SROME S 1996 Cleavage plane specification in *C. elegans*: How to divide the spoils. *Cell* 84: 195-98

YANAGAWA Y, HASEZAWA S, KUMAGAI F, OKA M, FUJIMURO M, NAITO T, MAKINO T, YOKOSAWA H, TANAKA K, KOMAMINE A, HASHIMOTO J, SATO T, NAKAGAWA H 2002 Cell-Cycle Dependent Dynamic Change of 26S Proteasome Distribution in tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol.* 43(6): 604-613